PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (*Theobroma cacao*) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador

Disertación previa a la obtención del título Licenciado en Ciencias Biológicas

JUAN FERNANDO LAGOS NARVÁEZ

QUITO, 2017

Certifico que la disertación de la Licenciatura de Ciencias Biológicas del Sr. Juan Fernando Lagos Narváez ha sido concluida con conformidad de las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la certificación correspondiente.

Patricia Portero, M. Sc

Director de la disertación

Quito, 3 de agosto de 2017

DEDICATORIA

A mi papá, por hacer de mí la persona que soy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Javier Carvajal, por inspirarme a seguir la difícil tarea del investigador y por abrirme la puerta del Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa (CNIB).

A la M.Sc. Patricia Portero por su amistad y paciencia y por transmitirme sus conocimientos y su pasión por las levaduras.

A Yeanina, Migue, Daniel, Juan Fer, Mela y Berni por su amistad y por hacer del trabajo de tesis una experiencia divertida.

A mi mamá y mi hermana, por su amor y paciencia incondicional y por darme una razón para siempre querer ser mejor. A mi segundo papá, Alf, por quererme como a un hijo.

A la casa 72. A los mejores abuelos que la vida me pudo dar: Alberto y Cecilia, al mejor ejemplo: mis tíos Paul, Beto, Andre y Malú y a mis primos amados: Martín, Isabella y Amelie.

A mis amigos Mari, Mafer, Gaby, Daniel, los dos Sebas y a todos con quienes aprendí dos o tres cosas de la vida. Por los viajes, las risas y los llantos.

A mí, por no perder la confianza.

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	microlitos (1 x 10 litros)
µm	micrómetro (0,01mm)
AAB	Acetic acid bacteria (bacteria ácido acética)
CLQCA	Colección de Levaduras Quito Católica
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
g	gramos
l	litros
LAB	Lactic acid bacteria (bacteria ácido láctica)
min	minutos
ml	mililitros (1 x 10^{-3} litros)
mM	milimolar (1 x 10^{-3} molar)
MSP-PCR	"Micro/Minisatellite-Primed PCR" (Análisis de Micro/Minisatélites por PCR)
pb	pares de bases
PCR	"Polymerase Chain Reaction" (Reacción en cadena de la Polimerasa)
RAPD	**"**Random Amplified Polymorphic DNA" (Amplificación al azar de AND polimórfico)
rARN	ácido ribonucleico ribosomal
RFLP	"Restriction Fragment Length Polymorphism" (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción)
Rpm	revoluciones por minuto
sp.	Especie
TBE	Solución buffer compuesta por Tris, ácido bórico y EDTA
TRIS	abreviado del compuesto orgánico Tris (hidroximetil) aminometano
V	voltios

YPD	“Yeast production α-Dextrose” (medio de cultivo)

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS…… X
1. RESUMEN..... 1
2. ABSTRACT..... 2
3. INTRODUCCIÓN..... 3
3.1. GENERALIDADES DE LEVADURAS 3
3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS 6
3.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS..... 6
3.4 LEVADURAS EN LA BIOTECNOLOGÍA..... 9
3.5 CACAO ECUATORIANO 10
4. OBJETIVOS..... 13
4.1 OBJETIVO GENERAL..... 13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13
5. METODOLOGÍA..... 14
5.1. ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS 14
5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CULTIVOS DE LEVADURAS A PARTIR DE FERMENTOS DE CACAO 14
5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS 15
5.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO..... 15
5.3.2 OBTENCIÓN DE PATRONES DE POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN ITS 15
5.3.3 SECUENCIAMIENTO DE LA REGIÓN 26S DEL ADNr 16
5.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS DE LEVADURAS 18
5.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA 18
5.4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA 18
5.4.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA 18

5.5. DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE ABUNDANCIA Y ESPECIALIZACIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS FERMENTADORAS DE CACAO EN EL CONTEXTO DEL ECUADOR 20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 22
6.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARA DETERMINAR ESPECIES DE LEVADURAS 22
1.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA 27
6.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA 27
6.2.2 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LEVADURAS FERMENTADORAS DE CACAO 31
6.3 DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE ABUNDANCIA Y DE ESPECIALIZACIÓN 36
7. CONCLUSIONES 41
8. LITERATURA CITADA 43
9. FIGURAS 50
10. TABLAS 52
11. ANEXOS 63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ocurrencia de especies identificadas en dos centros de apilamientos distintos en Atacames y Mindo. 53

Tabla 2. Caracterización microscópica de las levaduras identificadas evaluadas después de tres días de incubación en agar Yeast Mold a 25 °C. 54

Tabla 3. Caracterización morfológica de las colonias de las levaduras identificadas evaluadas después de siete días de incubación en agar Yeast Mold a 25 °C 55

Tabla 4. Perfiles de asimilación de azúcares de los 35 aislados de levaduras identificadas después de 21 días de incubación a 25 °C. 57

Tabla 5. Perfiles de fermentación de azúcares de los 35 aislados de levaduras identificadas después de 21 días de incubación a 25 °C.. 59

Tabla 6. Ocurrencia de especies de levaduras fermentadoras de cacao en 10 sustratos. 61

Tabla 7. Ocurrencia de especies de levaduras en diferentes ecosistemas y diferentes sustratos y cálculos de I_a (índice de abundancia) y I_s. (Índice de especialización). 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Asimilación de azúcares de 35 levaduras aisladas de fermentaciones de cacao 51

Figura 2. Fermentación de azúcares de 35 levaduras aisladas de fermentaciones de cacao 51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Fermentación de azúcares por levaduras incubadas durante 21 días a 25 °C 64

Anexo 2. Asimilación de azúcares por levaduras incubadas durante 21 días a 25 °C. 64

Anexo 3. Porcentajes de identidad del análisis en BLAST de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosómico de los aislados de la localidad de Mindo. 65

Anexo 4. Porcentajes de identidad del análisis en BLAST de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosómico de los aislados de la localidad de Atacames. 66

Anexo 5. Fotografías de las morfologías de las colonias representativas de las levaduras identificadas. Evaluación realizada después de siete días de incubación en YM agar a 25 °C. 67

Anexo 6. Fotografías microscópicas de especies de levaduras. Fotografías tomadas después de tres días de incubación en YM agar a 25^0C con microscopio de contraste de fase. 73

Anexo 7. Perfiles de RFLPs-ITS en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas. 79

1. RESUMEN

Los granos del cacao constituyen la materia prima para la elaboración del chocolate. La fermentación de los azúcares presentes en la pulpa de estos provoca la muerte del embrión y, a su vez, una serie de reacciones responsables de generar los precursores del sabor del chocolate. En este estudio se caracterizó fisiológicamente y se identificó mediante el uso de técnicas moleculares, como RFLPs de la región ITS y el secuenciamiento del dominio D1/D2 del segmento 26S del rDNA, la microbiota de levaduras fermentadoras de cacao de dos localidades del Ecuador. Se identificaron 16 especies de levaduras correspondientes a *Candida albicans, C. boidinii, C. intermedia, C. orthopsilosis, C. tropicalis, Debaryomyces hansenii, Galactomyces candidum, Hanseniaspora opuntiae, Kodamaea ohmeri, Meyerozyma guilliermondii, Pichia kudriavzevii, Rhodotorula dairenensis, Saccharomyces cerevisiae, Trichosporon asahii, T. terricola* y *Wickerhamomyces anomalus*. Dos especies del género Candida, aún no descritas, también fueron aisladas e identificadas en este estudio. Adicionalmente, con la información de la base de datos de la CLQCA se analizaron siete ecosistemas y 10 sustratos para emplear los índices de abundancia (I_a) y especialización (S_i) con el fin de entender la adaptabilidad de las levaduras para fermentar la pulpa del grano de cacao, así como el grado de especialización de estos microorganismos en ecosistemas ecuatorianos. Los índices de especialización más altos (0,92) fueron exhibidos por *Candida* sp., *G. candidum* y *T. terrícola*. Dada la correlación inversa entre los índices aplicados, estas especies también exhibieron los índices de abundancia más bajos (0,1). El estudio y comprensión de las especies involucradas y la fisiología referente a la fermentación y asimilación de azúcares del cacao, puede tener un impacto positivo sobre la calidad de esta materia prima ya que constituye un paso fundamental hacia la búsqueda de procesos de fermentaciones más controladas y confiables.

PALABRAS CLAVE: Granos de cacao, levaduras, fermentación, técnicas moleculares.

2. ABSTRACT

Cocoa beans are the raw material for chocolate elaboration. A proper fermentation of the sugars present in the cocoa bean pulps leads to the death of the embryo and, at the same time, to the formation of chocolate flavor precursors. In this study, the microbiote of yeasts involved in the fermentation process of cocoa beans from two localities in Ecuador was characterized physiologically, phenotypically and identified by using molecular techniques, such as RFLPs of the ITS region and sequencing of the D1/D2 domain of the rDNA. We were able to isolate 16 yeasts species responding to *Candida albicans, C. boidinii, C. intermedia, C. orthopsilosis, C. tropicalis, Debaryomyces hansenii, Galactomyces candidum, Hanseniaspora opuntiae, Kodamaea ohmeri, Meyerozyma guilliermondii, Pichia kudriavzevii, Rhodotorula dairenensis, Saccharomyces cerevisiae, Trichosporon asahii, T. terricola* and *Wickerhamomyces anomalus*. Two new species grouped in the Candida genera could also be isolated and identified. Additionally, based on the information of the presence of yeasts in seven ecosystems and ten substrates, from CLQCA data base, an abundance (I_a) and specialization index (S_i) were applied, in order to understand the adaptability of yeasts to ferment cocoa beans pulp as well as the degree of specialization of the isolated microorganisms in the Ecuadorian ecosystems. The highest specialization index (0,92) belonged to *Candida* sp., *G. candidum* and *T. terricola*. Given the inverse correlation between the applied indexes, this species also exhibited the lowest abundance index (0,1). A deeper understanding of the cocoa bean fermentation process may have a positive impact over this raw material quality. Therefore, identification of yeasts species using molecular techniques allows to determine the diversity of microorganisms involved in this process. Similarly, studying the physiology related to sugar assimilation and fermentation constitutes a crucial step towards a controlled and reliable fermentation processes.

KEY WORDS: Cocoa beans, yeasts, fermentation, molecular techniques.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES DE LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares, generalmente redondos, ovoides o cilíndricos, que se reproducen asexualmente por gemación y, en algunos casos, por fisión (Déak, 2008). Pueden también formar estados sexuales que no están encapsulados en un cuerpo fructífero (Walker, 1998). Por lo general, las levaduras forman pseudomicelios que son células alargadas dispuestas en forma de cadena, similares a los micelios formados por otros hongos, aunque existen también ciertas especies de levaduras que forman micelios verdaderos (Pascual, 2000). Dado que no se ha podido llegar a un consenso entre las numerosas relaciones observadas entre fenotipo y, a pesar de los avances en técnicas moleculares, genotipo, utilizar un concepto para definir a las levaduras resulta algo complicado (Hawksworth, 2006).

Las levaduras exhiben gran diversidad en relación a forma, tamaño y color. Se pueden observar formas elipsoidales/ovoides, cilíndricas con terminaciones esféricas, apiculadas, ojivales, triangulares, encorvadas, filamentosas, esféricas o elongadas. El tamaño celular es bastante variable entre las levaduras. Por ejemplo, se han reportado levaduras tan pequeñas cuya longitud varía entre 1-3 µm hasta otras mucho más grandes de entre 20-50 µm. No obstante, el ancho celular es un carácter menos variable, logrando hallarse levaduras con un ancho celular de entre 1-10 µm solamente. Entre estos microorganismos, es posible encontrarse con varias levaduras pigmentadas que pueden exhibir una gama de colores entre los que destacan el crema, blanco, negro, rosa, rojo, naranja y amarillo. Se ha observado entre las levaduras que incluso células individuales de un cultivo puro pueden mostrar heterogeneidad morfológica y colorimétrica. Segùn Walker (1998), este comportamiento polimórfico de las células de levaduras se ve catapultado por cambios nutricionales en el ambiente ya que la morfología celular podría ser inducida por alteraciones en las condiciones físicas y químicas.

Las células de levadura presentan todas las estructuras típicas de una célula eucariótica. Estas incluyen al citoesqueleto, al núcleo y a varias organelas como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, la mitocondria y los microcuerpos. Además, comparten ciertas características con las plantas, como la presencia de una vacuola y de una membrana plasmática rodeada por una pared celular rígida. Esta pared es una estructura delgada (100-200 nm), representando entre el 15-25% de la masa seca total de la célula, y constituye una característica sobresaliente de todas las levaduras (Walker, 1998).

La naturaleza unicelular de las levaduras las hace mejor adaptadas para sustratos líquidos o húmedos y superficies irregulares. Por este motivo, las levaduras se hallan típicamente en ambientes húmedos donde exista un abasto de nutrientes simples, solubles como azúcares y aminoácidos, ricos en fuentes de carbono. Esto explica por qué su crecimiento es común en la superficie de hojas y frutas, raíces y varios tipos de alimentos (Satyanarayana y Kunze, 2009). Además de que pueden degradar y utilizar una variedad de sustratos bajo diferentes condiciones ambientales, el rango de azúcares que las levaduras pueden asimilar aeróbicamente es amplio e incluye hexosas, pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos y varias otras fuentes de carbono. La utilización de pentosas y de algunos di y tri sacáridos está restringida entre las levaduras (Déak, 2008). La mayoría de las levaduras son aeróbicas y solo unas pocas toleran condiciones estrictamente anaerobias; estas pueden ser ubicadas en diferentes grupos basadas en sus respuestas de crecimiento a la disponibilidad de oxígeno (Querol y Fleet, 2006).

El aprovechamiento de los azúcares por las células es el primer paso en el catabolismo de las levaduras; este proceso es catalizado por transportadores específicos. En general, existen dos tipos de sistemas de transporte, llamados difusión facilitada y transporte activo (Déak y Beuchat, 1998). El mecanismo común para el metabolismo de carbohidratos por parte de los microrganismos es la conversión de glucosa-6-fosfato a piruvato por la vía Embden-Meyerhoff-Parnass. En las levaduras, esta vía glicolítica es la ruta principal para el catabolismo de azúcares gracias a la acción de enzimas requeridas para su

división y transformación. Después de la fosforilación por hexoquinasas de los azúcares libres externos o de oligosacaridos, una serie de reacciones convierte la glucosa-6-fosfato en piruvato. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato es oxidado por el ciclo del ácido tricarboxílico y la respiración. Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es fermentado para formar etanol y dióxido de carbono (Déak y Beuchat, 1998). Ambos procesos dependen de la glucólisis para producir ATP y piruvato a partir de fuentes de carbono, sin embargo, como producto de la respiración, las levaduras crecen y se reproducen con una efectividad más alta que con la fermentación. Existen especies de levaduras, *S. cerevisiae* por ejemplo, que son capaces de respirar y fermentar (Katz, 2012). La fermentación alcohólica es la característica más llamativa de un gran número de levaduras; solo unos pocos azúcares, hexosas o polisacáridos, pueden ser fermentados por ellas (Déak, 2008).

Las levaduras se reproducen por una variedad de mecanismos distintos. Estos pueden ser sexuales o asexuales, siendo los primeros los menos comunes. En condiciones ambientales desfavorables o de estrés, las células diploides de levadura se reproducen sexualmente, vía esporulación, formando esporas haploides del tipo α que eventualmente podrán conjugar para producir células diploides y así seguir con el ciclo (Cabej, 2012). La reproducción asexual, por otro lado, ocurre por gemación, fisión y por la producción de balistoconidias en tallos conocidos como esterigmas. Entre estos, el proceso asexual de gemación es el más común. Las gemas (células nacientes) pueden generarse tanto en las células de levadura como en las hifas celulares. La gemación es iniciada con la formación de una pequeña evaginación o protuberancia en la superficie celular. Durante el proceso, el tamaño de la célula parental permanece más o menos constante, mientras que la gema (blastoconidio) incrementa de tamaño para formar una nueva célula que en algún punto se separará de la levadura parental. Por otro lado, la reproducción por fisión es la duplicación de una célula asexual por medio de la formación de un septo interno que corta el eje más largo de la célula. La nueva célula fisionada se elonga y se vuelve a repetir el ciclo (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011).

3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

De acuerdo a su forma de reproducción, las levaduras pueden estar clasificadas en dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetes teleomórficas y anamórficas y levaduras basidiomicetes teleomórficas y anamórficas (Esteve-Zarzoso, 1999). Los ascomicetes forman ascas y los basidiomicetes forman basidios. Cuando no puede evidenciarse esporulación –levaduras imperfectas- se usa la tinción con sal de diazonio B para diferenciar entre ascomicetes y basidiomicetes. En el caso de las levaduras perfectas, pistas más grandes como el género de una levadura sin identificar puede ser alcanzada mediante un análisis visual de las ascas o los basidios. A pesar de esto, la forma de reproducción asexual o vegetativa provee una visión más universal hacia una posible identidad (Boulton y Quain, 2013).

Los tipos de división celular que ocurre dentro de las levaduras ascomicetes incluyen gemación multilateral, gemación bipolar y fisión. La gemación multilateral es el método primario de identificación en la mayoría de los clados. La gemación bipolar se restringe a ciertos géneros teleomórficos y sus anamorfos. La reproducción asexual en los basidiomicetes se da por gemación principalmente. Los sitios de gemación están confinados a cualquiera de los polos de la célula vegetativa que usualmente son elipsoidales o elongadas pero que también pueden ser isodiamétricas. Las células pueden estar cubiertas por una prominente cápsula de polisacáridos dando a los cultivos una apariencia mucoide (Webster y Weber, 2007).

3.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Tradicionalmente, combinar características fisiológicas y morfológicas, incluyendo patrones de crecimiento en medios específicos, ha sido la base de la identificación de levaduras (Miescher, Leischtfeld, y Gantenbein-Demarchi, 2016). Pruebas de asimilación y fermentación de monosacáridos como la glucosa y galactosa también son empleadas, así como de otras fuentes de carbono como maltosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, trihalosa y xilosa (Walker, 1998). A pesar de que estos métodos pueden dar resultados acertados, se ha demostrado que

métodos clásicos de identificación son laboriosos y a veces ambiguos, debido a la variabilidad entre cepas (Kurtzman y Robnett, 1998), lo que sugiere que trabajos realizados anteriormente necesitan ser revisados siguiendo técnicas de identificación más precisas.

En este contexto, en el área de la biología molecular se han desarrollado nuevas técnicas para identificar levaduras basadas en similitudes y disimilitudes de ADN, ARN o proteínas. Esto incluye patrones de aloencimas, hibridación DNA-DNA, cariotipeo electroforético, análisis de microsatélites, nested-PRC, entre otras. Sin embargo, todas estas técnicas son imprácticas para las rutinas de identificación dado que no existe una base de datos disponible que permita el análisis de nuevos resultados (Esteve-Zarzoso, 1999). Esta situación generó que surja el interés por otras comparaciones moleculares que incluyen el secuenciamiento, los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). De todos estos, el secuenciamiento aparenta ser el más robusto porque las comparaciones entre cepas son más sencillas de realizar y, con una selección de genes apropiados, relaciones cercanas y distantes entre levaduras pueden ser resueltas (Kurtzman y Robnett, 1998).

También existen varios métodos que han sido desarrollados para el estudio de las dinámicas de poblaciones incluyendo: T-RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminal, hibridación in situ fluorescente (FISH), gel de electroforesis con gradiente de temperatura (TGGE) y gel de electroforesis con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Nielsen, Hønholt, Tano-Debrah y Jespersen, 2005). Otras técnicas, como Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-TOF MS) han sido usadas ampliamente como una alternativa al secuenciamiento de genes, ya que provee de una identificación de microorganismos de alto rendimiento, sin embargo, solo unos pocos autores han reportado el uso de MALDI-TOF MS como un método de identificación de alto rendimiento de microorganismos en fermentaciones de alimentos (Miescher et al., 2016).

El descubrimiento de que el ARN ribosomal es altamente conservado en la naturaleza pero que tiene ciertos segmentos que son variables entre las especies ha llevado a un amplio uso del secuenciamiento del ADN ribosomal en el desarrollo de filogenias y en la taxonomía de los microorganismos. Por esta razón, las secuencias del ADN ribosómico han ganado vasto terreno en las rutinas de identificación. El ADN ribosomal de las levaduras consta de regiones conservadas y variables que se encuentran arregladas en repeticiones en tándem de cientos de copias por genoma. Las secuencias conservadas se encuentran en genes que codifican subunidades pequeñas (18S), 5.8S, 5S y largas (25-28S) de ARN ribosomal. Dentro de cada cluster, existen regiones de espaciadores variables entre las subunidades, llamadas regiones de espaciadores transcribibles internos (ITS), y entre los cluster de genes, llamados regiones de espaciadores intergénicos o la región de espaciadores no transcribibles (NTS). Todas estas regiones tienen el potencial para la identificación de levaduras, sin embargo, las regiones 18S, 26S e ITS se han llevado especial atención (Hocking, Pitt, Samson y Thrane, 2006).

Gracias a los avances científico-tecnológicos, se ha demostrado que las complejas regiones ITS, regiones no codificantes y variables, y el gen 5.8S del rRNA, codificante y conservado, son útiles midiendo relaciones genealógicas cercanas en los hongos dado que exhiben muchas más diferencias interespecíficas que los genes 18S y 25S del rRNA (Esteve-Zarzoso, 1999). El análisis por RFLPs (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción) de los segmentos de ADN ribosomal ha emergido como uno de los métodos más útiles para la identificación de levaduras asociadas a alimentos y bebidas. Las regiones preferidas para este análisis representa el segmento ITS1-5.8S-ITS2. Usando primers apropiados, este segmento es amplificado específicamente por PCR. Luego, el producto de PCR es cortado con endonucleasas de restricción específicas y los fragmentos resultantes son separados por gel de electroforesis. El tamaño de los amplicones (número de pares de bases) de ITS por si mismos puede ser de ayuda para discriminar entre especies de levaduras. El número y tamaño de los fragmentos determinados por los patrones de bandas en el gel son el principal principio usado para discriminar entre especies. Generalmente, más

de una enzima de restricción es necesaria para obtener discriminaciones inequívocas. Varios cientos de especies de levaduras asociadas a alimentos y bebidas han sido examinadas por este método y las bases de datos de perfiles de restricción para diferentes enzimas y especies de levaduras ha crecido notablemente gracias a la aplicación de este método (Hocking et al., 2006).

3.4 LEVADURAS EN LA BIOTECNOLOGÍA

Las levaduras son los mayores protagonistas en la industria biotecnológica, excediendo en producción y en beneficios económicos a cualquier otro grupo de microorganismos industriales. De hecho, la producción mundial anual de la levadura panadera *S. cerevisiae* puede llegar a exceder el millón de toneladas. Los beneficios económicos que generan las bebidas fermentadas también alcanza cifras gigantes; de hecho, la cerveza tuvo una producción mundial anual estimada en más de 60 millones de toneladas con una ganancia de total de 294,5 millones en el año 2006. En USA, más de 30 millones de toneladas de vino son producidas anualmente; el impacto económico de esta bebida y de los productos derivados de la uva en la economía norteamericana fue de más de 162 millones de dólares (Kurtzman et al., 2011).

En las últimas décadas, se han encontrado numerosas aplicaciones de las levaduras relacionadas a bioproductos, dada la capacidad de las levaduras para producir innumerables componentes bioactivos (Zhenming, Zhiqiang, Lingmei, Fang, Chunling, Xianghong y Haifeng 2006). Estas se ven involucradas en la producción de combustible de etanol, enzimas industriales, bioplasticos y metabolitos de bajo peso molecular (Branduardi, Smeraldi, y Porro, 2008). Del mismo modo, gracias a los avances en genómica funcional y biología sistemática, *S. cerevisiae* es considerada un organismo modelo para el estudio de la biología eucariótica y de enfermedades humanas. Además, se ha comprobado el rol de las levaduras en la agricultura como agentes de biocontrol, bioremediación y como un indicador de la calidad del ambiente (Kurtzman et al., 2011). Igualmente, algunas levaduras pigmentadas tienen interés biotecnológico dada la capacidad para producir astaxantina. Este pigmento es utilizado como colorante de comida de peces en las granjas de salmón; estos peces son incapaces de sintetizar este

compuesto de color rojo. Cepas de alto rendimientos de *Phaffia rhodozyma* pueden ser propagadas en materia primas de bajo costo como una alternativa económica a la astaxantina producida sintéticamente (Libkind, 2006).

Tal es la importancia de las levaduras en la industria que Bourdichon, Casaregola, Farrokh, Frisvad, Gerds, Hammes y Hansen (2012) incluyeron a 60 especies de levaduras en una lista de alrededor de 270 microorganismos responsables de la fermentación de distintos tipos de alimentos. Por este motivo, las fermentaciones de bebidas y alimentos llevadas a cabo por las levaduras se han convertido en materia de gran importancia científico tecnológica. De hecho, dada la importancia de la fermentación en las características organolépticas del chocolate, sus sabores y aromas han sido sujeto de numerosos estudios. (Schwan y Wheals, 2004). Los granos de la fruta del cacao (*Theobroma cacao*) son la materia prima del chocolate. Sin embargo, los granos crudos son muy astringentes y aún no han desarrollado los sabores típicos del chocolate apreciados por los consumidores en todo el mundo (Papalexandratou y Nielsen, 2016). Una fermentación posterior a la cosecha constituye un primer paso esencial en el desarrollo de estos sabores.

3.5 CACAO ECUATORIANO

El cacao (*Theobroma cacao*) es un árbol siempre verde de tamaño medio que crece hasta 15 m de altura. Los árboles de cacao crecen bien como plantas de sotobosque en ecosistemas forestales húmedos con altos niveles de precipitación, estando mejor adaptados a altitudes superiores a 300 m y menores a 1200 m y a temperaturas que oscilan los 23 °C (Iwu, 2014).

El cacao ecuatoriano fino de aroma ha sido descrito como un cacao limpio, balanceado, con sabores y aromas únicos y con granos de buen tamaño. Por esta razón, el Ecuador provee el 63% del suministro mundial de cacao fino de aroma de la variedad Nacional dada la distinción de su sabor en el mercado durante siglos (ANECACAO, 2015). Según Vera-Montenegro *et al*. (2014), citando información obtenida del Banco Central del Ecuador en el año 2013, las exportaciones de granos cacao y cacao procesado representan un 1,9% del PIB,

representado un 4% de la tasa de empleo del país. Desafortunadamente, el cacao Ecuatoriano usualmente es pobremente fermentado y de calidad endeble, lo que explica sus precios bajos en el mercado mundial (Papalexandratou, Falony, Romanens, Jimenez, Amores, Daniel y De Vuyst, 2011).

El Ecuador es el séptimo país que más produce cacao en el mundo y es el primero en producción de cacao fino de aroma, englobando a más de la mitad de la producción mundial de este fruto. En términos generales, el Ecuador produce dos tipos de cacao: el complejo Nacional X Trinitario (cacao fino) y el cacao conocido como CCN-51. El primero de ellos, distinguido por su sabor “arriba”, es cultivado como un típico cultivo de cacao (baja inversión) por pequeños y medianos productores y representa 85% de todo el cacao cultivado en el país. Por su lado, el cacao CCN-51 es cultivado por grandes productores con una inversión más alta. Los híbridos de alto rendimiento de Nacional x Trinitario representan las variedades con sabor “arriba” que actualmente son cultivados, en su mayoría, en plantaciones a larga escala (Papalexandratou et al., 2011).

El rol de la economía del cacao en Ecuador está subdesarrollado en comparación con su potencial por lo que existe la necesidad de mejorar la calidad y productividad del sector cacaotero del país que genera ingresos a alrededor de cien mil familias que viven de este cultivo pero que mantienen niveles de productividad muy bajos (Papalexandratou et al., 2011; CEPAL, 2014). A pesar de la reputación del cacao ecuatoriano, la información referente a la microbiota involucrada en el proceso de fermentación de este es escasa (Papalexandratou y Nielsen, 2016). Este estudio caracterizará e identificará mediante técnicas moleculares la microbiota de levaduras fermentadoras de cacao de dos localidades (Atacames y Mindo) con el fin de determinar las especies de levaduras involucradas en este proceso. El estudio del proceso de fermentación del cacao puede tener un impacto positivo sobre la calidad de esta materia prima (de Melo, Pedrozo, Ramos y Schwan, 2012). Se ha demostrado que las levaduras son los principales responsables de generar los precursores del sabor del chocolate, por lo que generar conocimiento de las levaduras que lo fermentan,

así como de sus características fisiológicas, es un paso fundamental hacia la búsqueda de procesos de fermentación más controlados y confiables.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar levaduras fermentadoras de cacao provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a nivel fenotípico y fisiológico las levaduras fermentadoras de cacao
- Identificar a nivel de especie las levaduras fermentadoras de cacao utilizando técnicas moleculares.
- Determinar los índices de abundancia y especialización de las levaduras fermentadoras de cacao en el Ecuador.

5. METODOLOGÍA

5.1. ÁREA DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

Las levaduras analizadas provienen de muestras de granos de cacao tomados de dos centros de acopio ubicados en dos localidades distintas; el primero se encuentra en Mindo (Provincia de Pichincha) y el segundo en Atacames (Provincia de Esmeraldas). Se seleccionaron estos puntos de colecta dada la facilidad de acceso a los centros de acopio para obtener muestras de los cajones fermentadores de cacao.

5.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CULTIVOS DE LEVADURAS A PARTIR DE FERMENTOS DE CACAO

Para el aislar y purificar cultivos de levaduras, se tomó 25g de la pulpa mucilaginosa de los granos en proceso de fermentación de los cajones fermentadores. Esta se sumergió en una bolsa con 225 ml de agua peptonada al 0,1% estéril y se agitó por 5 minutos hasta obtener una suspensión uniforme. Posterior a esto, se realizaron diluciones en serie en agua peptonada al 0,1%. Para la obtención de colonias aisladas, se realizó la siembra en superficie de 0,1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en placas con agar YM (extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3%, peptona 0,5%, glucosa 1% y agar 2%) y 100 mg/L de oxitetraciclina. (Ho, Zhao, y Fleet, 2014). Se incubó por 72 horas a 27 °C .

Finalmente, para la obtención de cultivos puros de levaduras, se sembró mediante estrías por agotamiento una colonia de las levaduras (diferenciadas por morfología macroscópica) con un asa de siembra en cajas Petri conteniendo agar YM. Se incubó por 72 horas a 27 °C.

5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS

5.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la extracción del ADN genómico, se agregó 0,4 g de micro esferas de vidrio (425-600 µm de diámetro) y 500 µl de buffer de lisis (50 mmol Tris; 250 mmol NaCl; 50 mmol EDTA pH 8, SDS 0,3%) en micro tubos de 1,5 ml. A estos se les añadió biomasa de levadura (48-72 horas de cultivo) con puntas estériles, los tubos se agitaron durante 3 minutos, en molino Restch mm400 a máxima velocidad para luego colocarlos a 65 °C, durante una hora, en una incubadora Thermo Scientific 1-690. Se agitaron nuevamente los tubos durante tres minutos y se colocaron en una centrífuga Sorvall RMC 14 durante 30 minutos a 8500 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se midió la concentración de ácidos nucleicos por espectrofotometría en Nanodrop 2000. El ADN se conservó a -20°C (Libkind, Brizzio, Ruffini, Gadanho, van Broock y Sampaio, 2003).

5.3.2 OBTENCIÓN DE PATRONES DE POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN ITS

Para amplificar la región ITS mediante PCR, se empleó el protocolo utilizado por Esteve-Zarzoso (1999). Para esto, se utilizaron los primers sintéticos ITS1 (5’ - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3’) e ITS4 (5’- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3’). Para la reacción de PCR se utilizó un volumen final de 50 µl que contuvo: 24,6 µl de H2O libre de nucleasas, 10 µl de buffer GoTaqR 5X, 3 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 4 µl Mix dNTPs 10 mM, 3 µl de primer ITS1 5 µM, 3 µl de primer ITS4 5 µM, 4 µl de GoTaqR polimerasa 5 U/µl y 5 µl de ADN genómico con una concentración de 0,2 µg/50µl.

Los ciclos de temperatura para la PCR fueron: fase de desnaturalización inicial a 94 °C durante cinco minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 93 °C

durante un minuto, annealing a 55 °C por dos minutos, extensión a 72 °C por dos minutos y extensión final a 72 °C por diez minutos.

El producto de PCR fue verificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% corrido a 100 V durante 40 minutos. Se cargaron 5 µl de muestra y en cada gel se incluyeron 6 µl de marcador de peso molecular de 100 pb TrackIt™ DNA Ladder. Las bandas fueron teñidas utilizando bromuro de etidio y evidenciadas en un transluminador spectroline

Para un reconocimiento a nivel interespecífico de las levaduras, se realizó la caracterización por RFLPs de la región ITS. El producto de PCR-ITS fue digerido usando tres enzimas de restricción: HhaI (secuencia de reconocimiento 5´ CGC CC), HaeIII (secuencia de reconocimiento 5´ GG CC) y HinfI (secuencia de reconocimiento 5´ GANT C). La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 15 µl conteniendo 5 µl del mix para RFLP-PCR (2 µl de buffer de reacción REact 2 10X, 2,2 µl de H_2O libre de nucleasas y 0,8 µl de enzima de restricción 10 U/µl) y 10 µl del producto de amplificación ITS (Esteve-Zarzoso, 1999). Finalmente, se incubó a 37 °C toda una noche.

El producto fue verificado por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0.8% corrido a 100 V durante 120 minutos. Este se cargó con aproximadamente 10 µl de muestra y se incluyó 6 µl de marcador de peso molecular de 100 pb TrackIt™ DNA Ladder en cada gel. Las bandas fueron evidenciadas mediante la tinción con bromuro de etidio en el transluminador y se compararon los perfiles de ITS-RFLPs con la base de datos de la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) para la determinación de las especies.

5.3.3 SECUENCIAMIENTO DE LA REGIÓN 26S DEL ADNr

Se llevó a cabo la amplificación de la región 26S del ADN ribosomal, para la identificación basada en secuenciamiento en caso de no haberla alcanzado con el método de RFLPs. Para la reacción de PCR, se utilizaron los primers sintéticos NL-1 (5´-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL-4 (5´-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman y Robnett, 1998). Se utilizaron los

siguientes perfiles de temperatura: fase de desnaturalización inicial a 94 °C durante diez minutos, 30 ciclos de annealing a 95 °C por 30 minutos, extensión a 60 °C por 45 minutos y extensión final a 72 °C por 45 minutos.

La reacción de PCR se preparó con un volumen final de 50 µl que contuvo: 31,6 µl de H2O libre de nucleasas, 10 µl de buffer GoTaqR 5X, 1 µl Mix dNTPs 10 mM, 1 µl de primer NL1 5 µM, 1 µl de primer NL4 5 µM, 0,4 µl de GoTaqR polimerasa 5 U/µl y 5 µl de ADN genómico a un concentración de 0,2 µg/50µl.

Para la purificación del producto de PCR del 26S de ADNr, se utilizó el sistema SV Gel and PCR Clean-up Wizard. Primero, se agregó igual volumen de Membrane Washing Solution que de producto de PCR a una minicolumna SV insertada en un tubo de recolección. Se transfirió el producto de PCR preparado a la minicolumna y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto para su posterior centrifugación a 16000 rpm. El sobrenadante fue descartado. Se agregó 700 µl de Membrane Wash Solution. Luego se centrifugó a 16000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se repitió el paso anterior sustituyendo el volumen de Membrane Wash Solution a 500 µl. Se centrifugó a 16000 rpm por cinco minutos. El tubo de colección fue vaciado para proceder a recentrifugar la columna por un minuto. La minicolumna fue transferida a un tubo limpio de 1,5 ml y se añadió 50 µl de agua libre de nucleasas para incubar a temperatura ambiente por un minuto y proceder a centrifugar a 16000 rpm por un minuto. Finalmente, se descartó la minicolumna y se conservó el ADN a 4 °C o -20 °C.

Los productos de amplificación de la región 26S del ADN ribosomal de los aislados de levaduras fueron enviados a Macrogen para su secuenciamiento. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank de la NCBI.

5.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS DE LEVADURAS

5.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

La caracterización microscópica de los aislados de levaduras se realizó en base a la descripción de la morfología celular. Las características a tomarse en cuenta fueron la forma de las células y el tipo de gemación. Para esto, en un portaobjetos, se colocó una gota de agua destilada estéril en la que se emulsificó una pequeña fracción de colonia de levadura; la gota se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente, se observó en un microscopio Olympus BX51 de contraste de fases, utilizando objetivo 100X lo cual facilitó evidenciar la morfología de las células de levaduras. (Portero y Paredes, 2011).

5.4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA

Para describir la morfología de las colonias de levaduras, se realizó la caracterización morfológica de las colonias después de ocho días de incubación a 25 °C en medio YM agar. Los parámetros a tomarse en cuenta fueron: forma del margen, elevación, superficie, brillo, textura y color (Portero y Paredes, 2011).

5.4.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Con el fin de conocer el perfil metabólico de las levaduras fermentadoras de cacao, se realizó la caracterización fisiológica de los aislados basada en el protocolo propuesto por Kurtzman et al. (2011). Así, se usó como sustrato soluciones YNB (Yeast Nitrogen Base) al 0,67% como fuente de nitrógeno y fuente de carbono al 2 % proveniente de nueve azúcares: glucosa, xilosa, maltosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, celobiosa y almidón soluble; a estas soluciones se las esterilizó por filtración a través de una membrana Millipore de 0,22 µm. Posteriormente, se colocó 5 mL de solución azucarada en un tubo de ensayo conteniendo una campana de Durham invertida. La biomasa de levaduras, sembrada en agar YM e incubada a 25 °C, fue resuspendida en 1 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, se inoculó 50 µl de la suspensión de levaduras

en cada uno de los tubos con azúcar y fuente de nitrógeno, por duplicado, y se incubó por 21 días a 25 °C.

La evaluación de fermentación se realizó a los tres, siete, 14 y 21 días basada en la generación de CO_2 observado en la campana Durham: +++, si la campana estaba completamente llena; ++, si estaba llena hasta la mitad; +, si estaba llena 1/3 de la campana o; – (negativo) si no se generó CO_2. Los perfiles de fermentación que se obtuvieron tras la lectura de las evaluaciones fueron los siguientes: L, retardada, campana llena con rapidez pero solo después de siete días; S, lenta, campana llena lentamente después de más de siete días; W, débil, campana no se llena completamente; -, negativa, no existe acumulación de gas. Los resultados referentes a fermentación se obtuvieron mediante el análisis a los 21 días de incubación a 25 °C (anexo 1). +, positiva, campana llena de CO_2 dentro de siete días

La evaluación de la asimilación de azúcares se realizó a los tres, siete, 14 y 21 días mediante la comparación de turbidez con el tubo control (YNB + cepa de levadura) como un indicio de crecimiento de levaduras, según lo propuesto por Kurtzman, Fell, Boekhout, y Robert, (2011). La evaluación se hizo mediante registro visual colocando los tubos sobre una superficie blanca en donde se trazaron líneas con tinta negra de alrededor de 5 mm. Los tubos fueron agitados para dispersar las levaduras en el medio. El resultado fue marcado como +++ si las líneas no se observaron, como ++ si se vieron difusas, + si se pudieron distinguir pero con bordes borrosos y negativo si se distinguieron con claridad. Los perfiles de asimilación que se obtuvieron tras la lectura de las evaluaciones son los siguientes: + (positivo), lectura ++ ó +++ después de una semana; L, retardada, lectura ++ ó +++ se desarrolla rápidamente pero después de dos semanas o más; W, débil, lectura 1+; S, lenta, lectura ++ ó +++ se desarrolla lentamente sobre las dos semanas; -, negativa (anexo 2).

5.5. DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE ABUNDANCIA Y ESPECIALIZACIÓN DE ESPECIES DE LEVADURAS FERMENTADORAS DE CACAO EN EL CONTEXTO DEL ECUADOR

Con el fin de conocer el grado de especialización de las especies de levaduras para fermentar la pulpa del cacao, y que tan abundantes son, en el contexto del Ecuador, se aplicaron los índices de especialización (S_l) y abundancia (I_a) desarrollados por Carvajal, Portero, Tufiño, Bastidas, Guamán-Burneo y Rosa (2014). La información utilizada se obtuvo de la base de datos de la CLQCA en función de la presencia de levaduras en 10 sustratos (fermentos relacionados a humanos, excremento de animal, exudado, flores, frutas, hongos, insectos, materia vegetal viva, materia vegetal en descomposición y madera en descomposición); y siete ecosistemas (Ecuador continental: región amazónica, región andina, región costa; y Ecuador Insular: Isla Floreana, Isla Isabela, Isla San Cristóbal e Isla Santa Cruz); la aplicación de estos índices fue posible dado que las muestras estudiadas en la presente investigación fueron consideradas fermentos relacionados a humanos. Así, el índice de abundancia se entiende como el producto del total de ecosistemas en los que la especie ha sido registrada y el total de distintos sustratos que la especie ha sido capaz de colonizar. Los valores del índice de especialización cumplen con una relación inversa a los del índice de abundancia, dado que a menor especialización mayor es la abundancia de las levaduras.

Las ecuaciones a emplearse son:

$$I_a = \frac{(Sc * O)}{(Sm * Om)}$$

Donde:

I_a = Índice de abundancia

S_c = sustratos colonizados por la especie

O = ocurrencia

S_m = número máximo de sustratos analizados en la investigación

O_m = número total de ecosistemas analizados

$$S_I = \left(\frac{-\log 10 Ia}{2}\right) 1{,}8$$

Donde:

S_i = índice de especialización

I_a = Índice de abundancia

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR PARA DETERMINAR ESPECIES DE LEVADURAS

Las colectas realizadas en los centros de apilamiento de cacao permitieron obtener 35 aislados de levaduras; 18 de ellos corresponden a la localidad de Atacames y 17 a la de Mindo. Utilizando las técnicas moleculares, como el secuenciamento del dominio D1/D2 del segmento 26s del ADNr, se lograron identificar los 35 aislados de levaduras fermentadoras de cacao. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó el alineamiento y la búsqueda en la base de datos del NCBI de las especies más cercanas conocidas a la secuencia del gen analizado. Tomando como criterio el porcentaje de identidad, las especies identificadas en la localidad de Atacames corresponden a *C. boidinii, C. intermedia, D. hansenii, G. candidum, H. opuntiae, M. guilliermondii, R. dairenensis, S. cerevisiae, T. asahii, T. terricola* y *W. anomalus.* Por su parte, las especies identificadas en la localidad de Mindo corresponden a *C. tropicalis, C. albicans, C. boidinii, C. orthopsilosis, Candida* sp*., Candida* sp. Bq26*, H. opuntiae, K. ohmeri, M. guilliermondii, P. kudriavzevii* y *W. anomalus.* Además, mediante la caracterización por RFLPs de la región ITS, usando las enzimas de restricción HaeIII, HhaI y HinfI, se obtuvieron los perfiles de restricción correspondientes de las especies analizadas. Sin embargo, esta técnica permitió obtener únicamente la identidad de ocho de los 35 aislados correspondientes a *M. guilliermondii, K. ohmeri, S. cerevisiae, T. asahii,* y *P. kudriavzevii* y *W. anomalus* con dos aislados cada una.

Entre las levaduras identificadas, se encuentran especies que son recurrentes en procesos de fermentación; la ocurrencia de levaduras en las dos localidades muestreadas puede observarse en la tabla 1. Al igual que en otros estudios, se puede confirmar una población de levaduras fermentadoras de cacao bastante diversa y heterogénea. De hecho, solamente cuatro especies de levaduras identificadas (22.22%) fueron compartidas en ambas localidades; estas corresponden a *M. guilliermondii, H. opuntiae, W. anomalus y C. boidinii.*

La especie *M. guilliermondii* presentó el mayor número de aislados (cuatro) en el presente estudio. La presencia de esta especie coincide con los resultados obtenidos en Malasia por Meersman et al., (2013) donde, en un análisis a gran escala de fermentaciones espontáneas de cacao, también fue posible identificarla. De igual manera Fernández Maura, Balzarini, Clapé, Evrard, De Vuyst y Daniel (2016), de granos de cacao provenientes de Cuba, lograron identificar a esta especie mediante la combinación de técnicas de fingerprintings de PCR de ADN genómico y el análisis de las secuencias de la región ITS, de las regiones D1/D2 del gen de la subunidad larga del rRNA y del fragmento codificante del gen de la actina.

La especie *H. opuntiae* apareció en este estudio con un total de tres aislados. Esta especie es considerada una de las más frecuentes en procesos de fermentación de cacao (Daniel et al., 2009; Fernández Maura et al., 2016; Miescher et al., 2016) Por ejemplo, ha sido descrita como una especie elemental de la microbiota en procesos de fermentación de cacao en Malasia (Meersman et al., 2013). Esta especie de levadura también fue identificada en Ecuador, provincia de Los Ríos, aunque con un bajo protagonismo, en el proceso de fermentación examinado por Papalexandratou et al., (2011) usando como técnica de identificación la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización. En general, esta es una especie persistente a lo largo del proceso de fermentación, independientemente del origen del cacao y del método utilizado para fermentar los granos. De hecho, un estudio realizado en Ecuador, tanto en cajas como en plataformas de fermentación, exhibió la presencia de *Hanseniaspora* sp. (100% de identidad con *H. opuntiae, H. guilliermondii* y *H. uvarum*) y *P. kudriavzevii* (Papalexandratou y De Vuyst, 2011), lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente.

Asimismo, la especie *W. anomalus* presentó tres aislados. Esta especie también fue aislada e identificada en Malasia por Meersman et al., (2013). Según Papalexandratou y De Vuyst, (2011) esta especie es una de las protagonistas en los fermentos de grano de cacao, lo que podría explicar la presencia de esta en ambas localidades. Según Mateo, Maicas, y Thieen (2015), esta especie no tolera

la presencia de etanol, por lo que se espera su presencia en la primera etapa de la fermentación del cacao.

La especie *C. boidinii* fue reportada anteriormente en fermentos de cacao de Belize por Schwan y Wheals (2004) y, en conjunto con *C. intermedia*, fueron las únicas dos especies de este género aisladas e identificadas de Atacames. *C. intermedia* fue encontrada en fermentos de cacao Cubano por Fernández Maura et al., (2016), en Australia por Ho et al., (2014) y en Belize por Schwan y Wheals, (2004).

De la colecta realizada en la localidad de Atacames, se lograron aislar e identificar nueve géneros y 11 especies, incluyendo las cuatro especies que coinciden en ambas localidades mencionadas anteriormente. Adicional a estas, en esta localidad se identificó a *S. cerevisiae, T. asahii, T. terricola, D. hansenii, G. candidum* y *R. dairenensis,*

Las levaduras de la especie *S. cerevisiae* presentaron un solo aislado. Esta ha sido identificada en numerosos estudios relativos a fermentos de cacao (Ardhana y Fleet, 2003; Schwan y Wheals, 2004; Jespersen et al., 2005; Nielsen et al., 2005; Daniel et al., 2009; Papalexandratou y De Vuyst, 2011; Papalexandratou et al., 2011; de Melo et al., 2012; Meersman et al., 2013; Miescher et al., 2016) debido a que existe evidencia de que es una levadura de rápido crecimiento y que presenta alta tolerancia al etanol gracias a la presencia de ácidos grasos contenidos en la célula y también a que presenta una vigorosa actividad pectinasa y endo y exo proteasa, lo que influencia sobre la cantidad de aminoácidos libres en los fermentos contribuyendo benéficamente al sabor de los granos (Carvajal et al., 2014; Visintin et al., 2016).

La especie *T. asahii,* representada con un solo aislado, fue identificada en la localidad de Atacames. Varios estudios sobre fermentos de cacao han identificado levaduras del género *Trichosporon* (Ravelomanana, Guiraud, Vincent y Galzy, 1985; Schwan y Wheals, 2004). A esta especie ha sido posible encontrarla en la superficie de las vainas del cacao y en materiales asociados al proceso y es considerada como una especie importante en procesos de

fermentación de cacao proveniente de Ghana (Jespersen et al., 2005; Nielsen et al., 2005). En contraste, la localidad de Atacames reporta por primera vez la presencia de *T. terricola* asociada a este sustrato.

De la misma manera, en la localidad de Atacames, se reporta por primera vez en fermentos de cacao a *G. candidum* y *D. hansenii* con tres aislados cada una y *R. dairenensis* con un aislado únicamente. El género *Galactomyces* no ha sido encontrado en estudios previos relacionados a fermentos de cacao. La especie *D. hansenii* no ha sido encontrada en estudios previos sobre fermentos de cacao, sin embargo, representantes del género *Debaryomyces* han sido identificadas en estudios realizados en cacao proveniente de Ecuador y Brasil (Papalexandratou y De Vuyst, 2011; de Melo et al., 2013). Su presencia en este sustrato probablemente se deba a la baja tolerancia al etanol por parte de esta especie (Papalexandratou y De Vuyst, 2011). De igual manera, las levaduras de la especie *R. dairenensis* tampoco han sido identificada en fermentos de cacao, sin embargo, se han encontrado cepas pertenecientes al género *Rhodotorula* en Ecuador (Papalexandratou et al., 2011; Papalexandratou y De Vuyst, 2011), Indonesia (Ardhana y Fleet, 2003), Malasia (Meersman et al., 2013) y Ghana (Jespersen et al., 2005).

Por su parte, de la localidad de Mindo, se aislaron e identificaron a 11 especies de levaduras fermentadoras de cacao ubicadas dentro de siete géneros. Además de las especies coincidentes en ambas localidades mencionadas anteriormente, en esta localidad también fue posible aislar e identificar dos aislados de *P. kudriavzevii* y dos de *K. ohmeri.*

Las levaduras de la especie *P. kudriavzevii* aparece como recurrente en los procesos de fermentación de cacao realizados por Ravelomanana et al., (1985), Papalexandratou y De Vuyst, (2011); Fernández Maura et al., (2016) y, según Meersman et al. (2013), esta especie también forma parte de la microbiota central de los fermentos de cacao provenientes de Malasia. Además de su termotolerancia (de Melo et al., 2013), su presencia se ve favorecida por la tolerancia a condiciones ambientales altamente selectivas presentes en la fermentación de la pulpa del cacao, como la presencia de estresantes químicos,

como etanol, ácido acético y ácido láctico (Meersman et al., 2013).Por su parte, la especie *K. ohmeri* fue identificada en las primeras etapas de fermentación de cacao proveniente de Ghana. De igual manera, Meersman et al., (2013) y Fernández Maura et al., (2016) lograron identificar aislados de esta especie en Malasia y Cuba, respectivamente. Además de en los granos, esta fue posible aislar de materiales asociados al proceso como canastas o las superficies de la vaina del cacao por Daniel et al., (2009).

Las muestras obtenidas de las fermentaciones llevadas a cabo en Mindo también permitieron identificar una alta diversidad del género *Candida*, incluyendo a dos especies aún no descritas: *Candida* sp. Bq26 y *Candida* sp. Además de estas dos especies también se identificaron a *C. tropicalis, C. albicans, C. boidinii, C. orthopsilosis.*

El género *Candida* exhibió el mayor número de aislados en el presente trabajo, con un total de 11, de los cuales 7 se aislaron de la localidad de la Mindo. Este género comprende el más amplio de levaduras a nivel mundial (Déak y Farkas, 2013) y se ha reportado que algunas especies de este dominan los estadios finales del proceso de fermentación de los granos de cacao (Ho et al., 2014). De hecho, varias de las especies halladas en la localidad de Mindo coinciden con estudios previos sobre fermentaciones de este sustrato. Por ejemplo, *C. orthopsilosis* ha sido aislada e identificada en los primeros estadios de fermentos de cacao en Ghana y Cuba (Daniel, Vrancken, Takrama, Camu, De Vos y De Vuyst, 2009; Fernández Maura et al., 2016). *Candida tropicalis*, una especie considerada como cosmopolita, ha sido identificada en diversos estudios asociados a fermentos de cacao (Ardhana y Fleet, 2003; Schwan y Wheals, 2004; Daniel et al., 2009; Papalexandratou et al., 2011; Meersman et al., 2013; Fernández Maura et al., 2016).

Adicional a estas especies se pudo identificar a la levadura que no han sido reportada en estudios previos relacionados a fermentos de cacao como la levadura patógena *C. albicans*. En este proceso se puede observar una variable contaminación ambiental microbiana causada por la masa inicial de la pulpa del grano de cacao y las prácticas agrícolas empleadas. La contaminación ambiental

es causada por el suelo circundante, el aire, el polvo e insectos, utensilios y el equipo usado en el proceso, así como las vainas del cacao y las hojas del plátano usadas para construir las pilas y cubrir los cajones (De Vuyst y Weckx, 2016). Esta situación puede justificar la presencia de esta especie en Mindo.

Todas las especies relacionadas a fermentos de este fruto se caracterizan por su capacidad para asimilar y fermentar las fuentes de carbono presentes en este sustrato. El primer paso para el aprovechamiento es el transporte de los azúcares al interior de la célula de levadura. Este proceso depende de cual y en que concentración se encuentra en el medio (Santillán y García, 1998), mientras que la capacidad de metabolizar o no azúcares está asociada a la producción de enzimas hidrolíticas (Déak, 2008). Además, las especies descritas deben ser capaces de tolerar cambios en el pH, temperatura, contenido de azúcares y los metabolitos propios de la fermentación. Estas condiciones favorecen el crecimiento de aquellas cepas que están mejor adaptadas a este ambiente (Jespersen, Nielsen, Hønholt, Jakobsen, 2005; Nielsen et al., 2005).

6.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA

6.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se realizó la caracterización macroscópica y microscópica de las levaduras analizadas, con la finalidad de describir los distintos fenotipos involucrados en la microbiota de levaduras fermentadoras de cacao (tablas 2-3). En la mayoría de los aislados, la morfología descrita concuerda con la morfología descrita por Kurtzman, (2011).

A nivel macroscópico, tras realizar la evaluación a los 8 días de incubación a 25 °C, se pudo observar que existen diferencias entre los aislados en la morfología de las colonias. En su mayoría, se observaron colonias color crema con superficie lisa, opacas con márgenes enteros, elevación convexa, y textura butirosa. Se identificaron también, aunque en menor proporción, varios aislados con colonias planas y otros con margen rizoide (tabla 3). Las características macroscópicas de los aislados pertenecientes a la misma especie fueron iguales,

a excepción de *H. opuntiae, M. guilliermondii y P. kudriavzevii*; la morfología de las colonias de estas últimas exhibieron variación intraespecífica.

Las especies de levadura *K. ohmeri, D. hansenii, P. kudriavzevii, H. opuntiae* y *M. guilliermondii* formaron colonias con coloraciones cremas; la superficie de estas levaduras fue lisa. En las dos últimas se pudo observar variación intraespecífica; así, los aislados de *H. opuntiae* presentaron dos aislados con margen entero y uno ondulado mientras que los de *M. guilliermondi* presentaron tres aislados con margen entero y uno con margen ondulado. A excepción de *C. intermedia,* todas las especies pertenecientes al género *Candida* presentaron el fenotipo crema de superficie lisa.

Además de colonias de superficie lisa con coloración crema, fue posible aislar e identificar levaduras que forman colonias blancas de superficie lisa, como *W. anomalous* y *C. intermedia.*

Las especies *G. candidum, T. terrícola, T. asahi* y *S. cerevisiae* también exhibieron coloración crema. La superficie de las colonias de las dos primeras especies fueron filamentosas, mientras que la de las dos últimas fue rugosas. Se ha reportado que las levaduras del género *Trichosporon* pueden presentar diversas morfologías; el color y la forma de las colonias va a depender del origen del aislado, pudiendo encontrarse principalmente colonias cremas, húmedas o secas. (Ichikawa, Hirata, Takei, Tagami, Murasawa y Ikeda., 2016; Sugita, 2011).

Finalmente, la especie *R. dairenensis* fue la única especie que forma colonias pigmentadas identificada en este sustrato. Según Sampaio (2011), los representantes de esta especie sintetizan pigmentos rojos o amarillos. La coloración de las colonias de *R. dairenensis* identificadas en el presente estudio, así como su consistencia mucoide, concuerdan con la literatura.

A nivel microscópico, fue posible diferenciar morfologías ovoides principalmente. También se observaron formas elongadas, globosas, semiglobosas y elipsoidales. La forma de reproducción asexual fue monopolar

principalmente aunque se observaron también gemas bipolares. Se observó que estas características son variables en las levaduras identificadas (tabla 2).

Las células de levaduras *H. opuntiae, M. guilliermondii, W. anomalous, K. ohmeri, T. terricola y R. dairenensis* identificadas en este estudio presentaron formas celulares ovoides y reproducción asexual por gemación monopolar. *H. opuntiae,* además, mostró reproducción asexual por gemas bipolares. El tipo de gemación de estas especies mostró discrepancias con las expuestas por la literatura. Sin embargo, la morfología celular coincide con las propuestas por Cadez y Smith, 2011; Kurtzman, 2011; Lachance y Kurtzman, 2011; Sampaio, 2011; Sugita, 2011, donde se menciona que estas especies pueden mostrar morfologías celulares ovoides.

Las levaduras de las especies *P. kudriavzevii* y *T. asahi* exhibieron células elongadas con reproducción asexual por gemas monopolares. Las levaduras de ambas especies pueden presentar variación morfológica intraespecífica. En la especie *P. kudriavzevii* se ha reportado que la reproducción asexual se produce mediante la gemas multilaterales de base angosta (Kurtzman, 2011; Sugita, 2011).

Los géneros S*accharomyces* y *Debaryomyces*, con las levaduras identificada como *S. cerevisiae* y *D. hansenii,* exhibieron morfología celular globosa. La reproducción asexual en la primera de ellas se dio por gemas monopolares, lo que contrasta con la descripción realizada por Martini y Martini, (2011) donde indica que las gemas son multilaterales. Por su parte, *D. hansenii* presentó gemas multipolares, característica que coincide con la descripción realizada por Suzuki, Prasa y Kurtzman, (2011).

El género *Candida* presenta una alta variación fenotípica. Esta característica pudo ser observada en los aislados identificados en el presente estudio; dentro de este género pudieron distinguirse morfologías elongadas, globosas y ovoides. La gemación observada fue monopolar en los seis aislados correspondientes al género. Estas levaduras muestran morfologías globosas, elipsoidales, cilíndricas o elongadas, en algunas ocasiones ojivales, triangulares o

lunares. También pueden presentar formas ovoides (Mayer, Wilson y Hube, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que la reproducción asexual en este género se da por gemación holoblástica (Lachance, Boekhout, Scorzetti, Fell, y Kurtzman, 2011).

A pesar de que la morfología celular y el tipo de gemación de las especies identificadas coinciden con la expuesta por la literatura, en las levaduras, estos caracteres muestran una alta variación (Kurtzman, 2011), pudiendo encontrarse cepas que presentan morfologías y formas de reproducción distintos a los expuestos en este estudio.

La morfología celular de las levaduras involucra varios eventos celulares como la progresión a través del ciclo celular, el establecimiento de la polaridad de la célula y la regulación del tamaño celular (Yang, Ohnuki, y Ohya, 2014).

La heterogeneidad entre las especies tanto en características macroscópicas como microscópicas probablemente se deba a que durante el proceso de fermentación de cacao se produce una sucesión ecológica con cambios microambientales como la disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, presencia y concentración de ácidos orgánicos, así como de oxígeno (Jespersen et al., 2005). En este contexto, se ha demostrado que las levaduras son capaces de interactuar, de cambiar su comportamiento social de acuerdo a sus condiciones ambientales. De hecho, en un estudio realizado por Reis, Faraco, Guarnieri, Colombic y Ceccato-Antonini (2016) se reveló que la diferenciación en dos fenotipos de *S. cerevisiae* (colonias lisas y rugosas) está relacionada a la resistencia al stress provocado por altas concentraciones de azúcar y etanol y a pH bajos. Esta condición influyen sobre la morfología de las colonias para el beneficio de toda la población (Kuthan, Devaux, Janderová, Slaninová, Jacq y Palková, 2003). Reis et al., (2016) también plantean que las diferencias en los tipos de colonias podría deberse más a diferencias en la expresión de ciertos genes que a secuencias de ADN en sí. De hecho, técnicas desarrolladas recientemente han permitido el análisis cuantitativo de la relación entre las distintas características morfológicas y la deleción de genes no esenciales: estas revelaron que la deleción de 500 genes no esenciales es necesaria para el

mantenimiento de la estabilidad fenotípica (Yang et al., 2014). Esta característica permite explicar la alta heterogeneidad, dentro y entre las especies, en las características microscópicas y macroscópicas de las levaduras analizadas.

La identificación de levaduras ha estado y estará basada en la combinación de métodos fenotípicos y moleculares, dándole un enfoque multi-metodológico a este proceso. Se debe considerar caracteres fenotípicos importantes como la apariencia de la colonia y morfología de la colonia. Estructuras especializadas como hifas, artroconidias o balistoconidias pueden decir mucho acerca de la identidad de las levaduras. La forma de la célula es a menudo diagnóstico para diferenciar entre especies de levaduras muy similares en su actividad bioquímica. Estos caracteres fenotípicos son importantes para no tomar ciegamente los resultados de identificaciones rápidas (Pincus et al., 2007). Adicionalmente, el desarrollo de sistemas rápidos de identificación de levaduras se enfoca hacia la detección directa de enzimas o al análisis de la composición química de la célula por cromatografía gas-líquido o métodos similares. Sin embargo, uno de los principales problemas que deben ser resueltos cae en la necesidad de generar información morfológica de las levaduras para el trabajo de identificación basado en estos métodos (Lin y Fung, 2009) por lo que este trabajo, además de exhibir la alta diversidad morfológica involucrada en el proceso de fermentación del cacao, sienta las bases para futuras identificaciones de levaduras presentes en este sustrato basadas en métodos morfológicos.

6.2.2 CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LEVADURAS FERMENTADORAS DE CACAO

Se realizó la caracterización fisiológica de las levaduras colectada, con la finalidad de determinar el metabolismo de levaduras involucradas en el proceso de fermentación y obtener los perfiles de asimilación y fermentación de los aislados.

La glucosa y la sacarosa fueron los dos azúcares mejor asimilados y fermentados por las levaduras (Figura 1-2). La presencia de estos azúcares en los granos y la capacidad de transportar estas hexosas al interior de la célula, los

convierte en un sustrato beneficioso para el crecimiento de numerosos microorganismos (Boles y Hollenberg, 1997).

En las pruebas de asimilación mostrados en la tabla 4, se ve que todos los aislados de levaduras lograron asimilar la glucosa. En total, treinta y dos de los aislados (91,42%) presentaron una asimilación positiva de este azúcar. El porcentaje restante (8,58%) corresponde a los aislados de *M. guilliermondii*, *R. dairenensis*, *D. hansenii* y *T. asahii* que presentaron asimilación positiva retardada.

En las pruebas de fermentación, en total, veintisiete (77,14%) de los aislados lograron fermentar positivamente glucosa, cuatro (11,42%) la fermentaron de manera retardada. Fermentaciones lentas y débiles de glucosa fueron exhibidas por dos aislados cada una (5,71%). Al contrario, únicamente dos aislados (5,71%) correspondientes a *R. dairenensis* y *D. hansenii* dieron resultados negativos para fermentación de glucosa (tabla 5).

Las fuentes de carbono preferidas por la mayoría de las levaduras son las hexosas como la glucosa y fructosa, presentes en altas concentraciones en los granos de cacao, y manosa, dado que pueden entrar directamente a la vía glicolítica. Antes del ingreso a esta vía metabólica, el primer paso y limitante para el metabolismo de la glucosa es su transporte a través de la membrana. El consumo de este azúcar por parte de estas levaduras está mediado por una gran familia de proteínas asociadas al transporte de fuentes de carbono (Tripodi, Nicastro, Reghellin, y Coccetti, 2015). Esta característica se vio reflejada en los perfiles de fermentación obtenidos, donde quince de las dieciocho especies aisladas lograron fermentar este azúcar.

El segundo azúcar mejor asimilado por las levaduras caracterizadas fue la sacarosa. En total, trece de los aislados (37,14%) asimilaron positivamente la sacarosa; el mismo número se pudo evidenciar para positivos débiles. Una asimilación positiva retardada pudo ser observada en cinco de los aislados (14,28%) y lenta en tres de ellos (8,57%). Del mismo modo, solamente tres

aislados (8,57%), dos de ellos correspondientes a *H. opuntiae* y uno a *G. candidum* no asimilaron sacarosa (tabla 4).

En comparación con la glucosa, el número de aislados que registraron fermentación de sacarosa fue casi a la mitad. En total, catorce (40,00%) especies (?) de estos lograron fermentar este azúcar positivamente, cinco (14,28%) lo hicieron de manera retardada, dos lenta (5,71%) y uno débil (2,85%); quince aislados no fermentaron este azúcar (42,85%).

Especies como *Candida* sp. Bq26, *C. intermedia, D. hansenii, K. ohmeri, M. guilliermondii, S. cerevisiae, T. terrícola y W. anomalous* exhibieron perfiles metabólicos que les permitió utilizar sacarosa. Estos coinciden con los perfiles mostrados en la literatura (Kurtzman et al., 2011; Suzuki et al., 2011; Lachance y Kurtzman, 2011; Martini y Martini, 2011; Sugita, 2011). Se ha demostrado que este azúcar es convertido a glucosa y fructosa en especies como *S. cerevisiae* para su aprovechamiento; este suceso se da lugar en la membrana celular de las levaduras gracias a una invertasa periplásmica. La expresión del gen de la invertasa (SUC2) es reprimido cuando existen altas concentraciones de glucosa y reactivado cuando la concentración de este azúcar baja (Walker, 2008).

La pulpa del grano de cacao contiene, en promedio, 14% de azúcares; de estos, 60% es sacarosa y un 39% una mezcla de glucosa y fructosa (Schwan y Wheals, 2004). La asimilación y fermentación con la eficiencia mostrada probablemente se deba a que las levaduras identificadas muestran cierto grado de especialización para fermentar este sustrato gracias a la presencia de las proteínas y enzimas antes menciondas.

Azúcares como la maltosa, galactosa, celobiosa, rafinosa y almidón soluble también pudieron ser aprovechados por las levaduras estudiadas, aunque en menor proporción que la glucosa y la sacarosa. Existe poca evidencia que muestre que las levaduras puedan transportar intactos a los sacáridos superiores específicos como la rafinosa o el almidón (Walker, 2008). De hecho, de las más de 150 especies capaces de metabolizar almidón, solo unas cuantas tienen la combinación de enzimas conformadas por α-amilasas y glucoamilasas necesarias

para la utilización de este azúcar (Eksteen, Van Rensburg, Cordero Otero, y Pretorius, 2003).

Dos especies lograron fermentar maltosa: *S. cerevisiae*, descrita como una fermentadora vigorosa por Martini y Martini (2011) y *W. anomalous*. En esta última, la fermentación de azúcares como la galactosa, maltosa o rafinosa es variable (Kurtzman et al., 2011). A diferencia de la invertasa utilizada para metabolizar sacarosa, la maltasa (α-glucosidasa) no está localizada en la pared celular de las levaduras. Así, se ha observado que en levaduras como *S. cerevisiae* el transporte de la maltosa se da por un mecanismo protón-simporte dependiente de energía. El azúcar es hidrolizado, gracias a una maltasa intracelular, a dos moléculas de glucosa, para luego entrar en la vía glicolítica (Walker, 2008).

Las especies *C. intermedia* y *S. cerevisiae* fermentaron galactosa. Estudios realizados en *S. cerevisiae* han demostrado que una vez que esta especie crece en este medio, el azúcar es transportado por dos procesos: uno de alta afinidad dependiente de galactoquinasas y uno de baja afinidad independiente de galactoquinasas. Tanto el sistema de baja como de alta afinidad inducido por galactosa son mediados por el mismo transportador dado que ambos dependen de la expresión del gen de la galactosa permeasa, GAL2 (Szkutnicka, Tschopp, Andrews, y Cirillo, 1989).

La especie *H. opuntiae* fue la única capaz de fermentar positivamente la celobiosa. Dependiendo de la especie, se han observado distintas estrategias entre las levaduras para la utilización de celobiosa. Una de ellas consiste en la expresión de β-glucosidasas extracelulares en la superficie celular; la celobiosa es hidrolizada extracelularmente para que posterior a esto la glucosa sea transportada y metabolizada al interior de la célula. La segunda estrategia consiste en la vía fosforilítica, donde la celobiosa es transportada al interior de la célula por celodextrinas para que una fosforilasa intracelular corte el disacárido con un fosfato inorgánico, produciendo una molécula de glucosa y una a-glucosa-1-fosfato que pueden ser metabolizadas rápidamente. La vía hidrolítica es la tercera estrategia; el azúcar es transportado al interior de la célula por

celodextrinas para luego ser hidrolizada por una β-glucosidasa en dos moléculas de glucosa que pueden ser fácilmente metabolizadas por la célula (Eriksen, Hsieh, Lynn, y Zhao, 2013).

La lactosa y la xilosa no pudieron ser asimiladas ni fermentadas por las levaduras caracterizadas en este estudio. Se pudo evidenciar que existen diferencias en la capacidad para asimilar y fermentar entre las especies y dentro de una misma especie.

Ninguna de la especies aisladas e identificas pudo fermentar xilosa. Esto probablemente se deba a que las levaduras involucradas en los fermentos de cacao carecen de la habilidad para operar el sistema protón-simporte, sujeto a represión catabólica, y el sistema de difusión facilitada para el transporte y aprovechamiento de este azúcar (Kilian y van Uden, 1988). Además, su metabolismo no es capaz de llevar a cabo la vía pentosa fosfato, que es la ruta bioquímica utilizada para metabolizar este azúcar.

Al igual que la xilosa, ninguna especie pudo fermentar la lactosa. Este azúcar puede ser asimilada o fermentada por las levaduras mediante el transporte vía inducción de una lactosa-permeasa y su hidrolización subsecuente a glucosa y galactosa por una β-glucosidasa intracelular. Puede operar también un sistema de transporte de difusión facilitada cuando las células crecen en medios anaeróbicos. La activación del gen de la lactosa-permeasa (LAC12) está acompañada del crecimiento en lactosa o galactosa (Walker, 2008).

Sin excepción a la regla, las levaduras que tienen la capacidad de fermentar un carbohidrato tienen también la capacidad de crecer en él. Sin embargo, existen varias especies de levaduras que creen aeróbicamente en azúcares que no logran fermentar (Kurtzman, 2011). El mecanismo de adquisición de nutrientes, el número isoenzimas y la regulación en la fermentación y respiración difiere sustancialmente entre las levaduras, lo que hace de ellas un grupo metabólico complejo y altamente heterogéneo (Rodrigues, 2006). Esta distinción logra explicar las diferencias intra e interespecíficas en los perfiles fisiológicos de asimilación y fermentación de azúcares de las levaduras

identificadas en el presente estudio. Dado que las levaduras son usadas en procesos biotecnológicos la investigación de estos mecanismos no es solo tema de interés académico sino que es importante para propósitos de índole económicos (Boles y Hollenberg, 1997).

6.3 DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE ABUNDANCIA Y DE ESPECIALIZACIÓN

Con el fin de entender la adaptabilidad de las levaduras para fermentar la pulpa del grano de cacao, así como el grado de especialización de estos microorganismos en ecosistemas ecuatorianos, se empleó un modelo matemático desarrollado por Carvajal et al., (2014). Este modelo muestra una correlación inversa entre el "Índice de Especialización" (S_i) y el "Índice de Abundancia" (Ia). Los resultados se muestran en las tablas 6 y 7 y estos fueron obtenidos en relación al contexto del Ecuador.

Los índices de abundancia y especialización de las especies identificadas pueden ser observados en la tabla 7. Estos se obtuvieron contrastando la información de la base de datos de la CLQCA, la cual contiene el análisis de la presencia de levaduras en siete ecosistemas (región amazónica, región andina, región costa, Isla Floreana, Isla Isabela, Isla San Cristóbal e Isla Santa Cruz) y 10 sustratos (excremento de animal, exudado, flores, frutas, hongos, fermentos relacionados a humanos, insectos, materia vegetal viva, materia vegetal en descomposición y madera en descomposición) (anexo 6). Para esto se hizo una comparación global del número de especies de levaduras que han sido encontradas en los diferentes sustratos tanto de Ecuador continental como de las Islas Galápagos. Esta comparación dio un esquema general de grado de especialización que las levaduras encaran en ecosistemas ecuatorianos.

Los índices de especialización más altos (0,92) les corresponden a *Candida* sp., *G. candidum* y *T. terricola*. Dada la correlación inversa entre los índices aplicados, estas especies también exhiben los índices de abundancia más bajos (0,1), ya que fueron colectadas e identificadas por primera vez en los fermentos de cacao analizados en el presente estudio. *Candida* sp. Bq26 es

segunda en la lista con un índice de 0,3, dado que esta fue aislada anteriormente de materia vegetal en descomposición.

Al contrario, *C. tropicalis* y *C. intermedia* presentan el índice de especialización más bajo (0,0 y 0,6, respectivamente) y, por lo tanto, los índices de abundancia más altos (1,0 y 0,77 respectivamente). Estas especies han sido aisladas de sustratos como excremento de animal, exudados, flores, frutas, hongos, fermentos relacionados a humanos, materia vegetal viva, materia vegetal en descomposición y madera en descomposición. La presencia de estas levaduras en diversos sustratos se debe a que están adaptadas a diferentes nichos ecológicos por lo que presentan un amplio rango de respuestas y estrategias de defensa a condiciones de estrés. De hecho, se ha reportado el crecimiento de *C. tropicalis* a temperaturas y pH restrictivos para una gran cantidad de microorganismos, lo que indica que esta especie posee características importantes en términos de tolerancia a ambientes extremos como los cajones de fermentación de cacao (Carvajal et al., 2014). Esto explica su abundancia en los distintos ecosistemas y sustratos ecuatorianos y la razón por la que es el aislado más frecuente en varios ecosistemas de acuerdo a la base de datos de la CLQCA. El presente estudio registra por primera vez la presencia de esta especie en fermentos relacionados a humanos. Debido a la correlación inversa entre los índices estas levaduras presentan el menor índice de especialización en el contexto del Ecuador.

El grado de especialización de las levaduras está dado por su metabolismo y tolerancia a factores ambientales como sustancias que inhiban su reproducción o crecimiento, a la radiación UV e inclusive a predadores microbianos (Carvajal et al., 2014). El proceso de fermentación del cacao involucra la acción de complejas interacciones microbianas, encabezadas principalmente por levaduras, bacterias ácido-lácticas (LAB) y bacterias ácido-acéticas (AAB). Estas interacciones son dirigidas por los cambios físicos y químicos que levaduras y bacterias atraviesan en el proceso de fermentación. La acidez inicial de la pulpa del grano de cacao (pH 3.0 - 4.0), en conjunto con bajos niveles de oxígeno al inicio de la fermentación (24h - 48h) favorecen la colonización de las levaduras (de Melo et

al., 2016) que con su actividad depectinizante, son las responsables de la licuefacción de la pulpa del cacao, causando el drenaje de la pulpa (liberación de exhudados) y la reducción de su viscosidad que a la larga permite el ingreso de aire en la masa de la pulpa del cacao en fermentación; además del ingreso de aire, una pectinolisis óptima es importante para el control del grosor de las cáscaras del grano de cacao. Sin embargo, la actividad más importante a cargo de las levaduras es la producción de etanol a partir de carbohidratos, principalmente glucosa, dejando dióxido de carbono y glicerol como desechos.

La producción de etanol es un proceso exotérmico que causa un incremento de temperatura en la pulpa del grano de cacao fermentado que puede alcanzar los 40 °C dentro de las primeras 48h; este proceso se da lugar bajo condiciones anaeróbicas, ácidas y ricas en carbohidratos. Una parte de este se difundirá en los cotiledones del grano para ser oxidado a ácido acético por bacterias acéticas, consumido por levaduras aeróbicas, probablemente presentes durante las últimas fases aeróbicas de la fermentación o desaparecer por la evaporación o el goteo de exhudados. Además, las levaduras producen una serie de ácidos orgánicos (oxálico, fosfórico, succínico, málico y ácidos acéticos) que permeabilizan y matan los cotiledones del grano y algunos compuestos orgánicos volátiles (alcoholes, ácidos, pirazinas, aldehídos, cetonas) que pueden contribuir al sabor del chocolate o a la formación de sus precursores de aroma. Los cambios en el pH, temperatura, contenido de azúcares y metabolitos de la fermentación ejercen presión selectiva en los biotipos naturales ya existentes, favoreciendo a aquellas cepas que están mejor adaptadas a estos ambientes (De Vuyst y Weckx, 2016). Aunque se ha demostrado varias veces que varios grupos de microorganismos cumplen un rol en los fermentos de cacao, los microorganismos mejor adaptados para una evolución exitosa de la fermentación de esta materia prima son las levaduras (responsables de la degradación pectinolítica y producción de etanol) (Papalexandratou et al., 2011).

La fermentación del cacao se mantiene como un proceso empírico que no permite generar granos de calidad consistente. Este proceso se lleva a cabo sin un control de las condiciones ambientales lo que usualmente lleva a

fermentaciones sin éxito (de Melo et al., 2012). La industrialización de la fermentación del cacao ecuatoriano permitiría tener más control sobre la calidad de los granos de cacao y el chocolate derivado de ellos. Ejemplos similares se observan en productos como la cerveza, el vino o el yogurt que alguna vez fueron elaborados con procesos tradicionales pero que actualmente han sufrido una industrialización del proceso.

Tener conocimiento sobre las comunidades microbianas que afectan los parámetros químicos de las fermentación del cacao es esencial para un mejor manejo de los granos de cacao y la producción de chocolate de alta calidad (Batista et al., 2016). Un starter (cultivo de levaduras iniciadoras de la fermentación) funcional bien elegido permite la producción de granos de cacao uniformemente fermentado (carente de variación en el grado de fermentación y sin deviaciones de sabor) dentro de cuatro días, así como un chocolate estandarizado producido a partir de estos (De Vuyst y Weckx, 2016). Además, está establecido que cuando se usa un starter, el perfil del componente aromático se ve afectado. A pesar de estos esfuerzos, el uso de starters se ha restringido a fases experimentales por lo que es necesario realizar más investigación en varios aspectos de la ciencia y tecnología para que las fermentaciones de cacao alcance niveles similares a los de otros alimentos y bebidas fermentadas (de Melo, Magalhães, Gonzaga, da Silva y Schwan, 2013).

El cacao Nacional es una las variedades de cacao más finas dado el potencial de poseer sabores deseables inherentes. Por lo tanto, implementar investigación y tecnología a los procesos post-cosecha es un paso esencial para aprovechar las características del cacao ecuatoriano y proporcionar al mercado mundial un producto de excelente calidad (Schwan y Wheals, 2004). En el presente trabajo se pudo identificar una diversidad considerable de levaduras en ambas localidades. Este estudio expone posibles candidatas nativas para que en estudios posteriores se clarifiquen los efectos de las mismas en la fermentación y así poder realizar starters para tener fermentaciones de cacao controladas. De hecho, *P kudriavzevii, S cerevisiae* y *W. anomalous*, especies identificadas en esta investigación, son consideradas como las responsables de la formación de

los componentes aromáticos del cacao (Koné et al., 2015) por lo que su capacidad de producir aromas podría ser usada para mejorar las características sensoriales de los granos de cacao y la calidad del chocolate ecuatoriano. Además, con la información añadida a la base de datos de la CLQCA para obtener el índice de especialización de las levaduras analizadas, se podrá usar como una herramienta para futuras investigaciones relacionadas a la ecología de estos microorganismos en ecosistemas ecuatorianos.

7. CONCLUSIONES

1. Se identificaron y caracterizaron 35 aislados de levaduras clasificados dentro de diez géneros correspondientes a 18 especies: *C. tropicalis, C. albicans, C. boidinii, C. intermedia, C. orthopsilosis, Candida* sp., *Candida* sp. Bq26*, D. hansenii, G. candidum, H. opuntiae, K. ohmeri, M. guilliermondii, P. kudriavzevii, R. dairenensis, S. cerevisiae, T. asahii, T. terrícola* y *W. anomalus.*

2. Debido a la variabilidad entre cepas, la caracterización fenotípica y fisiológica no es una herramienta confiable para concluir sobre la identidad de las levaduras.

3. La variabilidad intra e interespecífica a nivel macro y microscópico de levaduras analizadas probablemente se deba al efecto de las condiciones ambientales que se caracterizan por tener influencia sobre el fenotipo de las levaduras.

4. Existen diferencias entre y dentro de las especies en los perfiles fisiológicos de asimilación azúcares.

5. La microbiota de levaduras analizada e identificada muestra una alta eficiencia para fermentar los azúcares presentes mayoritariamente en el grano de cacao. Al contrario, el metabolismo de estas no les permite fermentar azúcares como xilosa y lactosa, al igual que la mayoría de levaduras.

6. Las técnicas moleculares de identificación permiten obtener resultados más precisos y menos laboriosos, acerca de la identidad de las levaduras.

7. El análisis de las secuencias del dominio D1/D2 del segmento 26s del ADN ribósomico permiten la identificación de levaduras a nivel de especie.

8. La microbiota de levaduras identificada en este estudio presenta especies consideradas como esenciales en los procesos de fermentación de cacao de varias regiones del mundo.

9. Los cambios en el pH, temperatura, contenido de azúcares y metabolitos de la fermentación ejercen presión selectiva en los biotipos naturales ya existentes, favoreciendo a aquellas cepas que están mejor adaptadas a estos ambientes.

10. *Candida tropicalis* presenta el índice de especialización más bajo (0,0) en el contexto del Ecuador, dado que esta especie está adaptada a diferentes nichos ecológicos y que presenta un amplio rango de respuestas y estrategias de defensa a condiciones de estrés. Al contrario, *Candida* sp., *Galactomyces candidum* y *Trichosporon terricola* presentaron los índices de especialización más altos (0,92) en el contexto del Ecuador, debido a que han sido aisladas únicamente en los fermentos de cacao analizados en este estudio.

11. Debido a la relación inversa entre los índices aplicados, *C. tropicalis* presentó el índice de abundancia más alto (1,00). *Candida* sp., *G. candidum* y *T. terricola* presentaron los índices de abundancia más bajos (0,1).

12. Tres de las especies identificadas tienen potenciales aplicaciones biotecnológicas en la elaboración de starters para fermentaciones controladas, por lo que su capacidad podría ser usada para mejorar las características sensoriales de los granos de cacao y la calidad del chocolate Ecuatoriano.

8. LITERATURA CITADA

Asociación Nacional de Exportadores de Cacao-Ecuador ANECACAO (2015). CACAO NACIONAL: Un producto emblemático del Ecuador. Disponible en http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html

Ardhana, M. M., y Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 87–99. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3

Boles, E., y Hollenberg, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, *21*(1), 85–111. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00052-1

Boulton, C. y Quain, D. (2013). Brewing Yeast and Fermentation. Segunda edición. John Wiley & Sons. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=QpDVsu-vaBcC&printsec=frontcover&dq=Christopher+Boulton,+David+Quain&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiUk6DkpoXVAhVDOSYKHdffAFkQ6AEIJDAA#v=onepage&q=Christopher%20Boulton%2C%20David%20Quain&f=false

Branduardi, P., Smeraldi, C., y Porro, D. (2008). Metabolically engineered yeasts: “Potential” industrial applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *15*(1), 31–40. https://doi.org/10.1159/000111990

Cabej, N. (2012). Epigenetic Principles of Evolution. Primera edición. Elsevier Insights. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=kbzxD-ROs14C&printsec=frontcover&dq=Nelson+R.+Cabej&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiQwb_xnoXVAhVLRCYKHbk_BeQQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Nelson%20R.%20Cabej&f=false

Cadez, N. y Smith, T. (2011). Hanseniaspora Zikes (1912). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 421-434). USA: Elsevier

Carvajal, J., Barahona, P., Tufiño, C., Bastidas, B., Guamán-Burneo, C. y Rosa, C. (2014). World ’ s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher An Overview of the Yeast Biodiversity in the Galápagos Islands and Other Ecuadorian Regions.

Comisión Económica para América Latina y el Caribe CEPAL. (2014). Diagnóstico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador. Disponible en http://www.vicepresidencia.gob.ec/wp-content/uploads/2015/07/Resumen-Cadena-de-Cacao-rev.pdf

Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., y De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, *9*(5), 774–783. https://doi.org/10.1111/j.1567-

1364.2009.00520.x

Déak, T. (2008). Handbook of Food Spoilage Yeasts. Segunda edición. Taylor and Francis Group. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=RR21g8_2OXIC&printsec=frontcover&dq=yeasts+food&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=yeasts%20food&f=false

Déak, T. y Beuchat, L. (2008). Handbook of Food Spoilage Yeasts. Primera edición. CRC Press. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=kHIfoOja_1sC&printsec=frontcover&dq=Tibor+Deak,Larry+R.+Beuchat&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj53JDWnYXVAhXGyyYKHaAHBUIQ6AEIJDAA#v=onepage&q=Tibor%20Deak%2CLarry%20R.%20Beuchat&f=false

Déak, T. y Farkas, J. (2013). Microbiology of Thermally Preserved Foods: Canning and Novel Physical methods. DEStech publications, Inc. USA. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=bSiD79nlemYC&printsec=frontcover&dq=Tibor+De%C3%A1k,J%C3%B3zsef+Farkas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjvybyhhfPTAhWJZCYKHb-XCzcQ6AEIJTAA#v=onepage&q=Tibor%20De%C3%A1k%2CJ%C3%B3zsef%20Farkas&f=false

De Hoog, G. y Smith, M. (2011). Galactomyces Redhead y Malloch (1977). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 987-1279). USA: Elsevier

de Melo, G. V., Miguel, M. G. da C. P., Ramos, Cí. L., y Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(15), 5395–5405. https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12

de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., de Almeida, E. G., da Silva Coelho, I., y Schwan, R. F. (2013). Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical-chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, *161*(2), 121–133. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018

de Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T. y Soccol, C. R. (2016). Current state of research on cocoa and coffee fermentations. *Current Opinion in Food Science*, *7*, 50–57. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001

Eksteen, J. M., Van Rensburg, P., Cordero Otero, R. R., y Pretorius, I. S. (2003). Starch Fermentation by Recombinant Saccharomyces cerevisiae Strains Expressing the ??-Amylase and Glucoamylase Genes from Lipomyces Kononenkoae and Saccharomycopsis fibuligera. *Biotechnology and Bioengineering*, *84*(6), 639–646. https://doi.org/10.1002/bit.10797

Eriksen, D. T., Hsieh, P. C., Lynn, P. y Zhao, H. (2013). Directed evolution of a cellobiose utilization pathway in Saccharomyces cerevisiae by simultaneously engineering multiple proteins. *Microb Cell Fact*, *12*(1), 61. https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-61

Esteve-Zarzoso, B. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*(1 999), 329–337. https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329

Fernández Maura, Y., Balzarini, T., Clapé Borges, P., Evrard, P., De Vuyst, L. y Daniel, H.-M. (2016). The environmental and intrinsic yeast diversity of Cuban cocoa bean heap fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *233*, 34–43. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.012

Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Current Opinion in Biotechnology, 18(2), 170–175. http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.010

Hawksworth, D. L. (2006). Pandora's Mycological Box: Molecular sequences vs. morphology in understanding fungal relationships and biodiversity. *Revista Iberoamericana de Micología*, *23*(3), 127–133. https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70031-6

Ho, V. T. T., Zhao, J. y Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 72–87. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014

Hocking, A., Pitt, J., Samson, R. y Thrane, U. (2006). Advances in Food Mycology. Primera edición. Springer Science & Business Media. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=9xlIicZfQ5IC&pg=PA153&dq=Ailsa+D.+Hocking,John+I.+Pitt,Robert+A&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiu_qDqp4XVAhVBaxQKHRLZAGcQ6AEIJDAA#v=onepage&q=Ailsa%20D.%20Hocking%2CJohn%20I.%20Pitt%2CRobert%20A&f=false

Ichikawa, T., Hirata, C., Takei, M., Tagami, N., Murasawa, H. y Ikeda, R. (2016). Cell surface hydrophobicity and colony morphology of *Trichosporon asahii* clinical isolates. *Yeast*. https://doi.org/10.1002/yea.3220

Iwu, M. (2014). Handbook of African Medicinal Plants. Segunda edición. Taylor & Francis Group, LLC. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=GictAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Maurice+M.+Iwu&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Maurice%20M.%20Iwu&f=false

Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S. y Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Research*, *5*(4–5), 441–453. https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.11.002

Kilian, S. G. y van Uden, N. (1988). Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast Pichia stipitis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *27*(5–6), 545–548. https://doi.org/10.1007/BF00451629

Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Tachon, A. F. y Montet, D. (2015). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010

Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *73*(4), 331–371. https://doi.org/10.1023/A:1001761008817

Kurtzman, C. (2011). Pichia E. C. Hansen (1904). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 685-708). USA: Elsevier

Kurtzman, C. (2011). Meyerozyma Kurtzman y M. Suzuki (2010). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 621-625). USA: Elsevier

Kurtzman, C. (2011). Wickerhamomyces Kurtzman, Robnett y Basehoar-Powers (2008). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 621-625). USA: Elsevier

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. The Yeasts (Vol. 1). Elsevier B.V. http://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0

Lachance, M. y Kurtzman, C. (2011). Kodamaea Y. Yamada, T. Suzuki, Matsuda y Mikata emend. Rosa, Lachance, Starmer, Barker, Bowles y Sclag-Edler (1999). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 685-708). USA: Elsevier

Lachance, M., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J., Kurtzman, C. (2011). Candida Berkhout (1923). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 987-1279). USA: Elsevier

Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M. y Sampaio, J. P. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *84*(4), 313–322. https://doi.org/10.1023/A:1026058116545

Libkind, D. (2006). Levaduras carotenogénicas de ambientes acuáticos de la Patagonia Noroccidental Argentina. Aplicaciones biotecnológicas. Trabajo para la obtención del grado académico superior de doctor en bioquímica. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina

Mateo, J. J., Maicas, S. y Thieen, C. (2015). Biotechnological characterisation of exocellular proteases produced by enological Hanseniaspora isolates. International Journal of Food Science and Technology, 50(1), 218–225. https://doi.org/10.1111/ijfs.12654

Mayer, F. L., Wilson, D. y Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*(2), 119–28. https://doi.org/10.4161/viru.22913

Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P.-J., Saels, V., Struyf, N., … Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PloS One*, *8*(12), e81559. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081559

Miescher Schwenninger, S., Freimüller Leischtfeld, S. y Gantenbein-Demarchi, C. (2016). High-throughput identification of the microbial biodiversity of cocoa bean fermentation by MALDI-TOF MS. *Letters in Applied Microbiology*. https://doi.org/10.1111/lam.12621

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K. y Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast*, *22*(4), 271–284. https://doi.org/10.1002/yea.1207

Papalexandratou, Z. y De Vuyst, L. (2011). Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Yeast Research*, *11*(7), 564–574. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00747.x

Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M. y De Vuyst, L. (2011). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(21), 7698–7714. https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11

Papalexandratou, Z. y Nielsen, D. S. (2016). It's Gettin' Hot in Here: Breeding Robust Yeast Starter Cultures for Cocoa Fermentation. *Trends in Microbiology*, *24*(3), 168–170. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.003

Pascual, M. y Calderón, V. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Segunda edición. Ediciones Díaz de Santos. Version digital: https://books.google.com.ec/books?id=9EIfkks8uxMC&pg=PA142&dq=levaduras+alimentos&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=levaduras%20alimentos&f=false

Pincus, D. H., Orenga, S. y Chatellier, S. (2007). Yeast identification – past, present, and future methods. *Medical Mycology*, *45*(2), 97–121.

https://doi.org/10.1080/13693780601059936

Querol, A. y Fleet, G. (2006). Yeast in food and beverages. Edición. SpringerLink. Segunda edición. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=Cs296pWLCG4C&printsec=frontcover&dq=amparo+querol+y+graham+fleet&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=amparo%20querol%20y%20graham%20fleet&f=false

Ravelomanana, R., Guiraud, J. P., Vincent, J. C. y Galzy, P. (1985). The yeast flora of cocoa bean fermentation in the Ivory Coast. *Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *1*(4), 319–326. https://doi.org/10.1007/BF01553416

Reis, V. R., Antonangelo, A. T. B. F., Bassi, A. P. G., Colombi, D. y Ceccato-Antonini, S. R. (2016). Bioethanol strains of Saccharomyces cerevisiae characterised by microsatellite and stress resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.017

Rodrigues, F., Ludovico, P., leao. C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. En: Rosa C, Péter G, editors. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Berlin-Heidelberg: Springer. Recuperado de https://link.springer.com/book/10.1007%2F3-540-30985-3

Sampaio, P. (2011). Rhodotorula Harrison (1928) En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 361-369). USA: Elsevier

Sandor Katz (2012). The Art of Fermentation: An In-Depth Exploration of Essential Concepts and processes from around the wolrd (pág 71). Chelsea Green Publishing. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=-zmLa205d0QC&dq=The+Art+of+Fermentation:+An+In-Depth+Exploration+of+Essential+Concepts+and+processes+from+around+the+wolrd&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Schwan, R. F. y Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(4), 205–221. https://doi.org/10.1080/10408690490464104

Sugita, T. (2011). Trichosporon Behrend (1890). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 361-369). USA: Elsevier

Suzuki, M., Prasa, G. y Kurtzman, C. (2011). Debaryomyces Lodder y Kreger-van Rij (1952). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 361-369). USA: Elsevier

Szkutnicka, K., Tschopp, J. F., Andrews, L. y Cirillo, V. P. (1989). Sequence and structure of the yeast galactose transporter. *Journal of Bacteriology*, *171*(8), 4486–4493.

Tripodi, F., Nicastro, R., Reghellin, V. y Coccetti, P. (2015). Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1850*(4), 620–627. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.010

Tulasi Satyanarayana, Gotthard Kunze (2009). Yeast Biotechnology: Diversity and Applications (pág 21). Springer Science. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=jLFmiervaqMC&printsec=frontcover&dq=Yeast+Biotechnology:+Diversity+and+Applications&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjlu8ngkPPTAhWCJiYKHY7zCgoQuwUIKTAA#v=onepage&q=Yeast%20Biotechnology%3A%20Diversity%20and%20Applications&f=false

Vaughan-Martini, A. y Martini, A. (2011). Saccharomyces Meyen ex Reess (1870). En C. Kurtzman, J. Fell y T. Boekhout, The yeast: A taxonomic study (págs. 733-747). USA: Elsevier

Vera-Montenegro, L., Baviera-Puig, A. y García-Álvarez-Coque, J. M. (2014). Multi-criteria methodology: AHP and fuzzy logic in the selection of post-harvest technology for smallholder cocoa production. International Food and Agribusiness Management Review, 17(2), 107–124.

Walker, G. (1998). Yeast: Physiology and biotechnology. John Wiley & Sons Ltd. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=8rR-6Prg3TcC&printsec=frontcover&dq=yeasts&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjaiOri3ZbOAhUKqR4KHfdgDtAQ6AEIMzAD#v=onepage&q=yeasts&f=false

Webster, J. y Weber, R. (2007). Introduction to fungi (págs. 227-231). Cambridge University Press. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=SApIn7IEnucC&dq=ascomycetes+introduction+to+fungi&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Yang, M., Ohnuki, S. y Ohya, Y. (2014). Unveiling nonessential gene deletions that confer significant morphological phenotypes beyond natural yeast strains. *BMC Genomics*, *15*, 932. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-932

Zhenming, C., Zhiqiang, L., Lingmei, G., Fang, G., Chunling, M., Xianghong, W. y Haifeng, L. (2006). Marine yeasts and their applications in mariculture. Journal of Ocean University of China, 5(3), 251–256. http://doi.org/10.1007/s11802-006-0010-5

9. FIGURAS

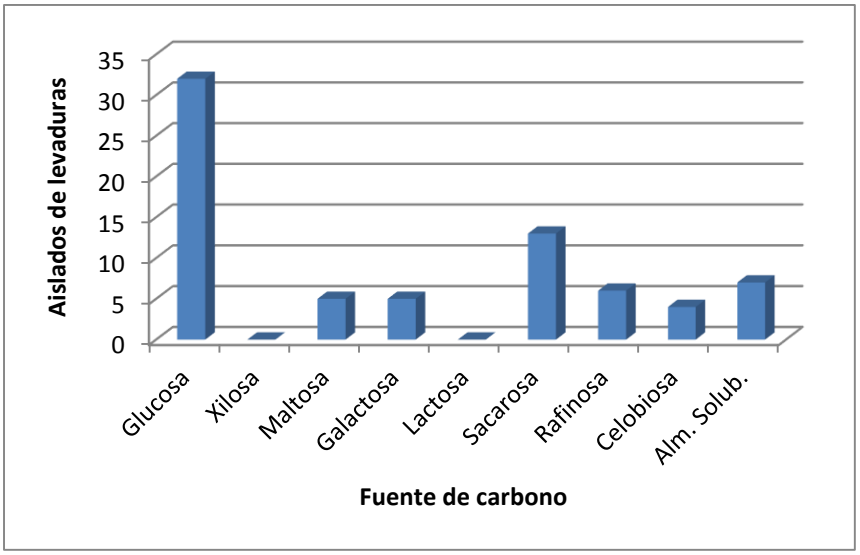


Figura 1. Asimilación de azúcares de 35 levaduras aisladas de fermentaciones de cacao

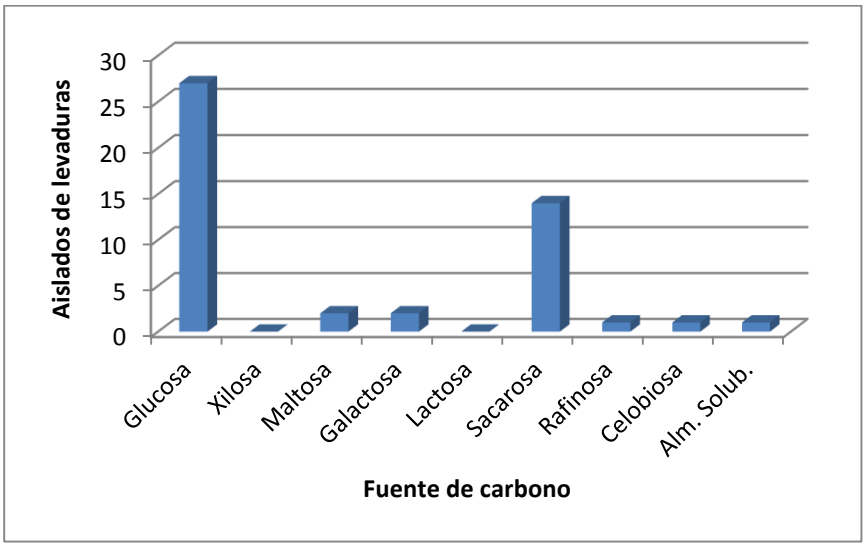


Figura 2. Fermentación de azúcares de 35 levaduras aisladas de fermentaciones de cacao

10. TABLAS

Tabla 1. Ocurrencia de especies identificadas en dos centros de apilamientos distintos en Atacames y Mindo.

Especies de levaduras	No. aislados	Esmeraldas	Pichincha
Candida tropicalis	1		X
Candida albicans	1		X
Candida boidinii	3	X	X
Candida intermedia	1	X	
Candida orthopsilosis	3		X
Candida sp. Bq26	1		X
Candida sp.	1		X
Debaryomyces hansenii	3	X	
Galactomyces candidum	3	X	
Hanseniaspora opuntiae	3	X	X
Kodamaea ohmeri	2		X
Meyerozyma guilliermondii	4	X	X
Pichia kudriavzevii	2		X
Rhodotorula dairenensis	1	X	
Saccharomyces cerevisiae	1	X	
Trichosporon asahii	1	X	
Trichosporon terricola	1	X	
Wickerhamomyces anomalus	3	X	X

Tabla 2. Caracterización microscópica de las levaduras identificadas evaluadas después de tres días de incubación en agar Yeast Mold a 25 °C.

No. Aislados	Especie	Forma	Tipo de gemación
1	*Candida tropicalis*	Subglobosa	Monopolar
1	*Candida albicans*	Globosa	Monopolar
3	*Candida boidinii*	Elongada	Monopolar
1	*Candida intermedia*	Ovoide	Monopolar
3	*Candida orthopsilosis*	Ovoide	Monopolar
1	*Candida sp. Bq26*	Ovoide	Monopolar
1	*Candida sp*	Elongada	Monopolar
3	*Debaryomyces hansenii*	Globosa	Multipolar
3	*Galactomyces candidum*	Subglobosa	Monopolar
3	*Hanseniaspora opuntiae*	Ovoide	Monopolar
2	*Kodamaea ohmeri*	Ovoide	Monopolar
4	*Meyerozyma guilliermondii*	Ovoide	Monopolar
2	*Pichia kudriavzevii*	Elongada	Monopolar
1	*Rhodotorula dairenensis*	Ovoide	Monopolar
1	*Saccharomyces cerevisiae*	Globosa	Monopolar
1	*Trichosporon asahii*	Elongada	Monopolar
1	*Trichosporon terricola*	Ovoide	Monopolar
3	*W. anomalus*	Ovoide	Monopolar

Tabla 3. Caracterización morfológica de las colonias de las levaduras identificadas evaluadas después de siete días de incubación en agar Yeast Mold a 25 °C

No. Aislados	Especie	Margen	Elevación	Superficie	Brillo	Textura	Color
1	*Candida tropicalis*	Rizoide	Umbilicada	Lisa	Opaca	Butirosa	Crema
1	*Candida albicans*	Entero	Convexa	Lisa	Opaca	Butirosa	Crema
3	*Candida boidinii*	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Butirosa	Crema
1	*Candida intermedia*	Rizoide	Convexa	Lisa	Opaca	Butirosa	Blanca
3	*Candida orthopsilosis*	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Butirosa	Crema
1	*Candida sp. Bq26*	Entero	Umbilicada	Lisa	Opaca	Butirosa	Crema
1	*Candida sp*	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Butirosa	Crema
3	*Debaryomyces hansenii*	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Butirosa	Crema
3	*Galactomyces candidum*	Rizoide	Plana	Filamentosa	Opaca	Butirosa	Crema
3	*Hanseniaspora opuntiae*	Entero/Ondulado	Plana	Lisa	Brillante/Opaca	Butirosa	Crema
2	*Kodamaea ohmeri*	Entero	Convexa	Lisa	Opaca	Butirosa	Crema
4	*Meyerozyma guilliermondii*	Entero/Ondulado	Convexa	Lisa	Brillante	Butirosa	Crema

Continuación Tabla 3. Caracterización morfológica de las colonias de las levaduras identificadas evaluadas después de siete días de incubación en agar Yeast Mold a 25 °C

No. Aislados	Especie	Margen	Elevación	Superficie	Brillo	Textura	Color
2	*Pichia kudriavzevii*	Rizoide	Plana	Lisa	Opaca	Butirosa	Blanca/ crema
1	*Rhodotorula dairenensis*	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Mucosa	Rosada
1	*Saccharomyces cerevisiae*	Ondulado	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Butirosa	Crema
1	*Trichosporon asahii*	Rizoide	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Friable	Crema
1	*Trichosporon terricola*	Rizoide	Umbilicada	Filamentosa	Opaca	Butirosa	Crema
3	*Wickerhamomyces anomalus*	Entero	Convexa	Lisa	Opaca	Butirosa	Blanca

Tabla 4. Perfiles de asimilación de azúcares de los 35 aislados de levaduras identificadas después de 21 días de incubación a 25 °C. (+) Positivo, (L) Positivo retardado, (S) Positivo lento, (W) Positivo débil, (-) Negativo.

Especie	GLU (a)	D-XIL (a)	MAL (a)	GAL (a)	LAC (a)	SAC (a)	RAF (a)	CEL (a)	ALM (a)
Candida albicans	+	-	+	W	-	W	-	W	+
Candida boidinii	+	- / S	- / W	- / S	-	W / L	- / W	W / S	S / L
Candida intermedia	+	-	S	+	-	+	S	-	S
Candida orthopsilosis	+	-	W / +	W / L	-	W	-	W	L / S
Candida sp	+	-	-	W	-	W	-	-	+
Candida sp. Bq26	+	-	W	-	-	+	-	W	W
Candida tropicalis	+	-	-	-	-	W	-	+	L
Debaryomyces hansenii	+ / L	- / W	W / S	+ / L /W	-	+ / L	+ / L	W / +	+ / S / W
Galactomyces candidum	+	W / +	L / -	- / + /W	-	L / W / -	- / W	W / S	W / S
Hanseniaspora opuntiae	+	-	W / -	-	-	- / W	- / L	W / S	W / S
Kodamaea ohmeri	+	W	W	S / L	-	+	+	L / +	W / +
Meyerozyma guilliermondii	+ / L	-	- / W	S / W / -	-	L / S / +	L / +	W / - / +	W / S / +
Pichia kudriavzevii	+	-	-	-	-	W	-	-	W / +
Rhodotorula dairenensis	L	-	W	-	-	S	W	W	W

Continuación tabla 4. Perfiles de asimilación azúcares de los 35 aislados de levaduras identificadas después de 21 días de incubación a 25 °C. (+) Positivo, (L) Positivo retardado, (S) Positivo lento, (W) Positivo débil, (-) Negativo.

Especie	GLU (a)	D-XIL (a)	MAL (a)	GAL (a)	LAC (a)	SAC (a)	RAF (a)	CEL (a)	ALM (a)
Saccharomyces cerevisiae	+	-	+	+	-	+	L	W	W
Trichosporon asahii	L	S	-	-	-	S	W	W	W
Trichosporon terricola	+	-	L	S	S	+	S	W	L
Wickerhamomyces anomalus	+	-	L / +	- / W	-	+	+ / L / W	W / L	S / L

Tabla 5. **Perfiles de fermentación de azúcares de los 35 aislados de levaduras identificadas después de 21 días de incubación a 25 °C. (+) Positivo, (L) Positivo retardado, (S) Positivo lento, (W) Positivo débil, (-) Negativo.**

Especie	GLU (f)	D-XIL (f)	MAL (f)	GAL (f)	LAC (f)	SAC (f)	RAF (f)	CEL (f)	ALM (f)
Candida albicans	+	-	-	-	-	-	-	-	W
Candida boidinii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida intermedia	+	-	S	+	-	+	W	-	-
Candida orthopsilosis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida sp	L	-	-	-	-	-	-	-	-
Candida sp. Bq26	+	-	-	-	-	+	-	L	-
Candida tropicalis	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Debaryomyces hansenii	+ / S / -	-	-	- / L	-	L / +	W / S / -	-	-
Galactomyces candidum	+ / L / W	-	-	-	-	L / -	-	-	-
Hanseniaspora opuntiae	+	-	-	-	-	- / S	-	- / +	- / +
Kodamaea ohmeri	+	-	-	-	-	+	W/ +	L / -	-
Meyerozyma guilliermondii	+ / L / S	-	-	- / S	-	+ / L	L / W	-	-
Pichia kudriavzevii	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhodotorula dairenensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuación tabla 5. Perfiles de fermentación de azúcares de los 35 aislados de levaduras identificadas después de 21 días de incubación a 25 °C. (+) Positivo, (L) Positivo retardado, (S) Positivo lento, (W) Positivo débil, (-) Negativo.

Especie	GLU (f)	D-XIL (f)	MAL (f)	GAL (f)	LAC (f)	SAC (f)	RAF (f)	CEL (f)	ALM (f)
Saccharomyces cerevisiae	+	-	+	+	-	+	W	-	-
Trichosporon asahii	L	-	-	-	-	W	-	-	-
Trichosporon terricola	+	-	L	L	-	+	-	-	-
Wickerhamomyces anomalus	+	-	L / +	-	-	+	W / L	- / L	-

Tabla 6. Ocurrencia de especies de levaduras fermentadoras de cacao en 10 sustratos. N.S= Número de sustrato, EA= Excremento de animal, EX= Exudado, FL= Flores, FR= Frutas, HON= Hongos, FRH= Fermentos relacionados a humanos, INS= Insectos, MVV= Materia vegetal viva, MVD= Materia vegetal en descomposición, MD= Madera en descomposición

ESPECIES LEVADURAS	N.S	EA	EX	FL	FR	HON	FRH	INS	MVV	MVD	MD
Candida albicans	2						1				1
Candida boidinii	5				1		1		1	1	1
Candida intermedia	9	1	1	1	1	1	1		1	1	1
Candida orthopsilosis	5			1	1		1	1		1	
Candida sp.	1						1				
Candida sp. Bq 26	2						1			1	
Candida tropicalis	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Debaryomyces hansenii	5	1		1			1	1			1
Galactomyces candidum	1						1				
Hanseniaspora opuntiae	2			1			1				
Kodamaea ohmeri	7	1		1	1		1	1	1	1	
Meyerozyma guilliermondii	7			1	1		1	1	1	1	1
Pichia kudriavzevii	8			1	1	1	1	1	1	1	1
Rhodotorula dairenensis	2			1			1				
Saccharomyces cerevisiae	8	1	1	1	1		1	1	1	1	
Trichosporon asahii	5			1			1	1		1	1
Trichosporon terricola	1						1				
W. anomalus	6			1	1		1	1		1	1

Adaptado de: Carvajal et al., (2014).

Tabla 7. Ocurrencia de especies de levaduras en diferentes ecosistemas y diferentes sustratos y cálculos de I_a (índice de abundancia) y $I_{s.}$ (Índice de especialización).

ESPECIES	OCURRENCIA EN ECOSISTEMAS	SUSTRATOS COLONIZADOS	ÍNDICE DE ABUNDANCIA (Ia)	ÍNDICE DE ESPECIALIZACIÓN (Si)
Candida tropicalis	7	10	1,00	0,00
Candida intermedia	6	9	0,77	0,06
Pichia kudriavzevii	5	8	0,57	0,12
Kodamaea ohmeri	5	7	0,50	0,15
Meyerozyma guilliermondii	5	7	0,50	0,15
Saccharomyces cerevisiae	4	8	0,46	0,17
Wickerhamomyces anomalus	4	6	0,34	0,23
Debaryomyces hansenii	4	5	0,29	0,27
Candida orthopsilosis	3	5	0,21	0,33
Trichosporon asahii	3	5	0,21	0,33
Candida boidinii	2	5	0,14	0,42
Hanseniaspora opuntiae	3	2	0,09	0,53
Candida albicans	2	2	0,06	0,62
Rhodotorula dairenensis	2	2	0,06	0,62
Candida sp. Bq 26	1	2	0,03	0,77
Candida sp.	1	1	0,01	0,92
Galactomyces candidum	1	1	0,01	0,92
Trichosporon terricola	1	1	0,01	0,92

Adaptado de: Carvajal et al., (2014).

11. ANEXOS

Anexo 1. Fermentación de azúcares por levaduras incubadas durante 21 días a 25 °C.

SIMBOLOGÍA	RESULTADO	DESCRIPCIÓN
+	Positivo	Lectura: campana de Durham se llena en una semana.
L	Positivo retardado	Lectura: campana de Durham se llena rápidamente después de una semana.
S	Positivo lento	Lectura: campana de Durham se llena lentamente después de dos semanas.
W	Positivo débil	Lectura: campana de Durham no se llena completamente.
-	Negativo	

Anexo 2. Asimilación de azúcares por levaduras incubadas durante 21 días a 25 °C.

SIMBOLOGÍA	RESULTADO	DESCRIPCIÓN
+	Positivo	Lectura: +++ o ++ en una semana
L	Positivo retardado	Lectura: +++ o ++ rápida en dos semanas
S	Positivo lento	Lectura: +++ o ++ durante la tercera semana
W	Positivo débil	Lectura: +
-	Negativo	

Anexo 3. **Porcentajes de identidad del análisis en BLAST de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosómico de los aislados de la localidad de Mindo.**

CÓDIGO	ESPECIE	%IDENTIDAD
CLQCA-01-023	*Candida tropicalis*	100%
CLQCA-01-024	*Pichia kudriavzevii*	99%
CLQCA-01-026	*Wickerhamomyces anomalus*	99%
CLQCA-01-027	*Candida albicans*	100%
CLQCA-01-028	*Candida* sp	99%
CLQCA-01-029	*Candida orthopsilosis*	100%
CLQCA-01-031	*Candida orthopsilosis*	100%
CLQCA-01-032	*Candida boidinii*	99%
CLQCA-01-033	*Hanseniaspora opuntiae*	99%
CLQCA-01-034	*Hanseniaspora opuntiae*	99%
CLQCA-01-036	*Meyerozyma guilliermondii*	99%
CLQCA-01-037	*Meyerozyma guilliermondii*	99%
CLQCA-01-038	*Candida orthopsilosis*	100%
CLQCA-01-039	*Kodamaea ohmeri*	99%
CLQCA-01-040	*Kodamaea ohmeri*	99%
CLQCA-01-041	*Candida sp. Bq26*	99%
CLQCA-01-043	*Pichia kudriavzevii*	100%

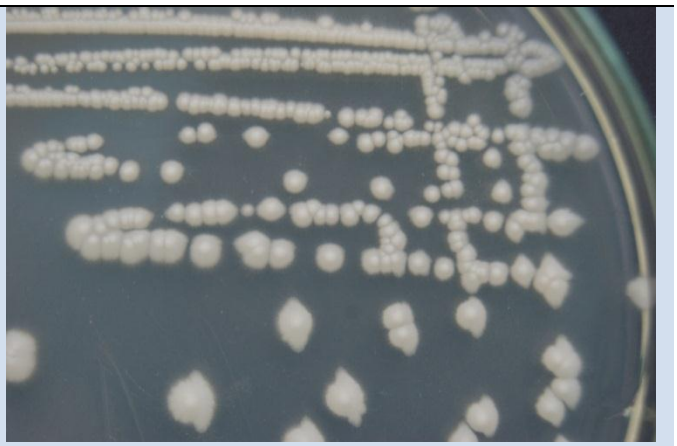
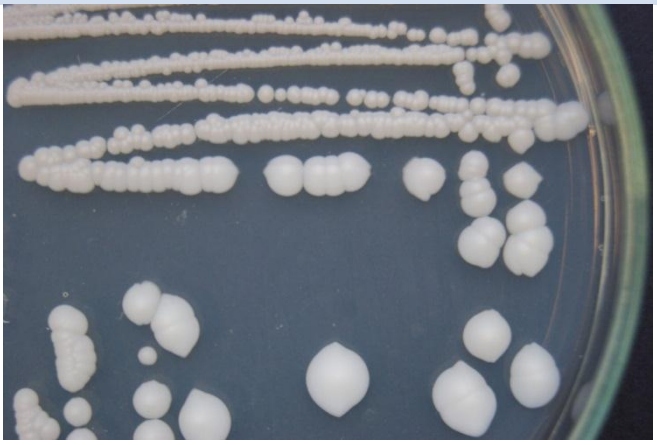
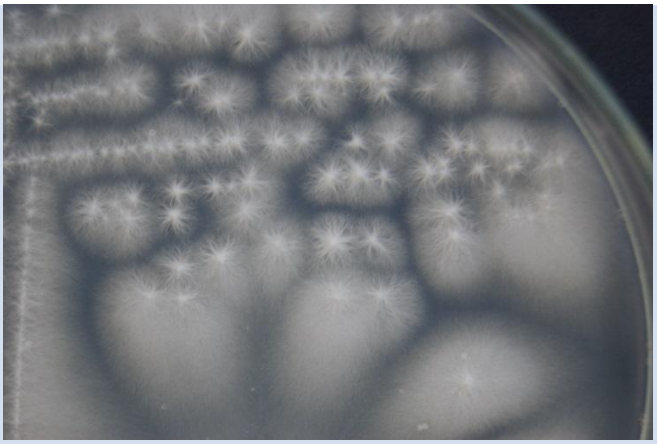
Anexo 4. Porcentajes de identidad del análisis en BLAST de los productos de PCR del dominio D1/D2 del segmento 26S del ARN ribosómico de los aislados de la localidad de Atacames.

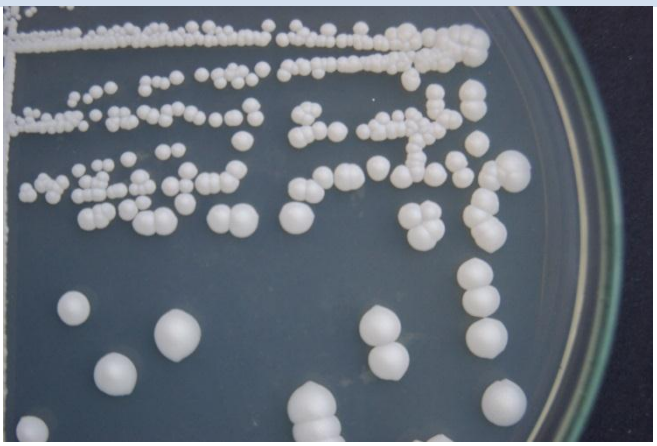
CÓDIGO	ESPECIE	%IDENTIDAD
CLQCA-10-673	*Candida boidinii*	99%
CLQCA-10-674	*Hanseniaspora opuntiae*	100%
CLQCA-10-675	*Saccharomyces cerevisiae*	100%
CLQCA-10-677	*Galactomyces candidum*	99%
CLQCA-10-678	*Galactomyces candidum*	98%
CLQCA-10-679	*Candida boidinii*	99%
CLQCA-10-680	*Galactomyces candidum*	98%
CLQCA-10-682	*Debaryomyces hansenii*	99%
CLQCA-10-684	*Trichosporon terricola*	99%
CLQCA-10-685	*Wickerhamomyces anomalus*	100%
CLQCA-10-686	*Candida intermedia*	100%
CLQCA-10-687	*Rhodotorula dairenensis*	98%
CLQCA-10-688	*Debaryomyces hansenii*	99%
CLQCA-10-689	*Debaryomyces hansenii*	99%
CLQCA-10-690	*Meyerozyma guilliermondii*	99%
CLQCA-10-691	*Meyerozyma guilliermondii*	99%
CLQCA-10-692	*Trichosporon asahii*	100%
CLQCA-10-693	*Wickerhamomyces anomalus*	100%

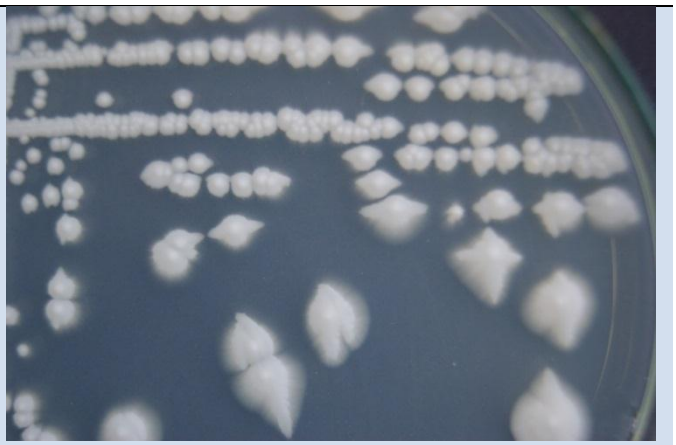
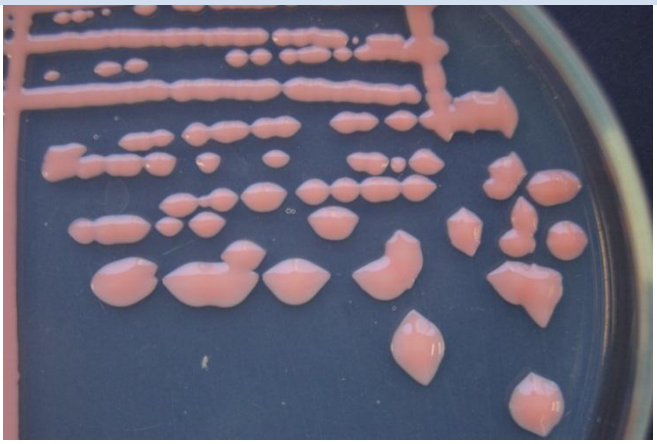
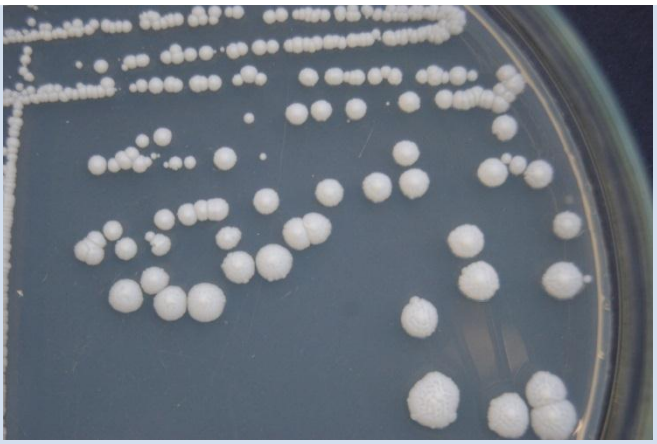
Anexo 5. Fotografías de las morfologías de las colonias representativas de las levaduras identificadas. Evaluación realizada después de siete días de incubación en YM agar a 25 °C.

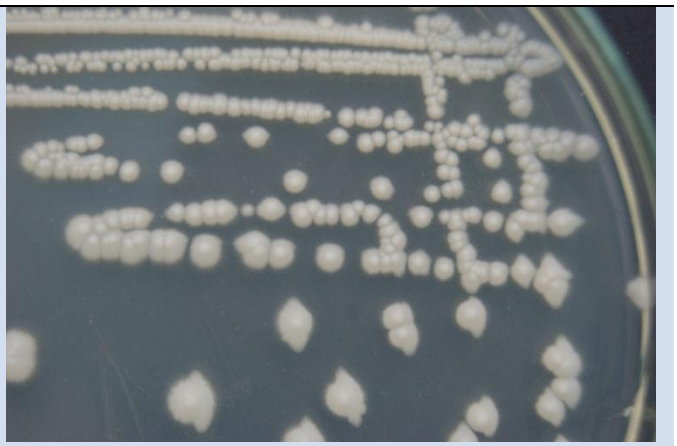
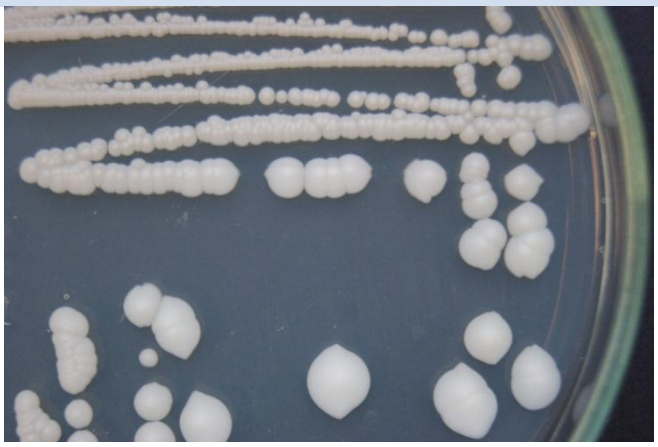
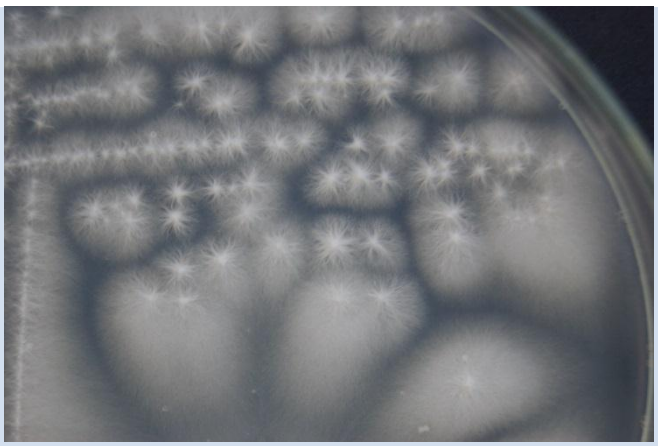
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-027	*Candida albicans*	
CLQCA-01-032 CLQCA-10-673 CLQCA-10-679	*Candida boidinii*	
CLQCA-10-686	*Candida intermedia*	

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-029 CLQCA-01-031 CLQCA-01-038	*Candida orthopsilosis*	
CLQCA-01-028	*Candida* sp.	
CLQCA-01-041	*Candida* sp. Bq 26	

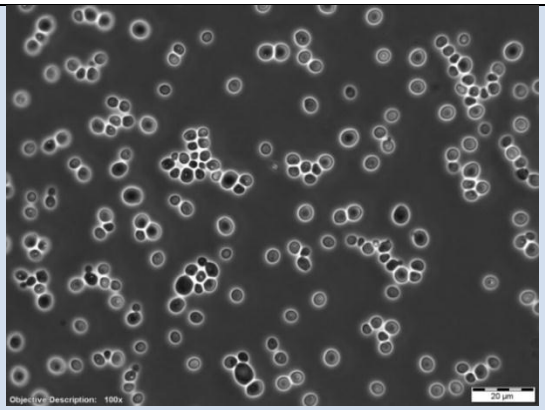
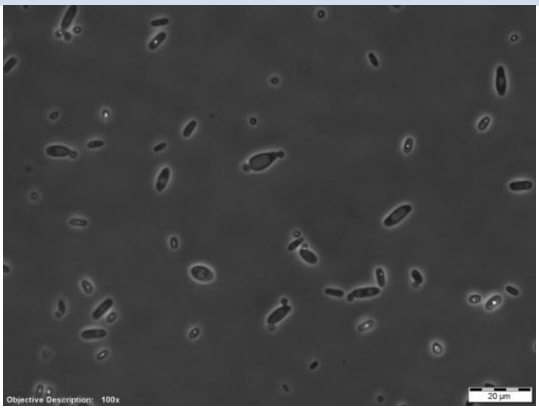
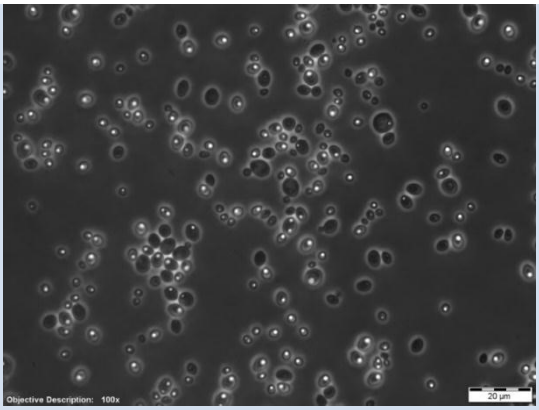
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-023	*Candida tropicalis*	
CLQCA-10-682 CLQCA-10-688 CLQCA-10-689	*Debaryomyces hansenii*	
CLQCA-10-677 CLQCA-10-678 CLQCA-10-680	*Galactomyces candidum*	

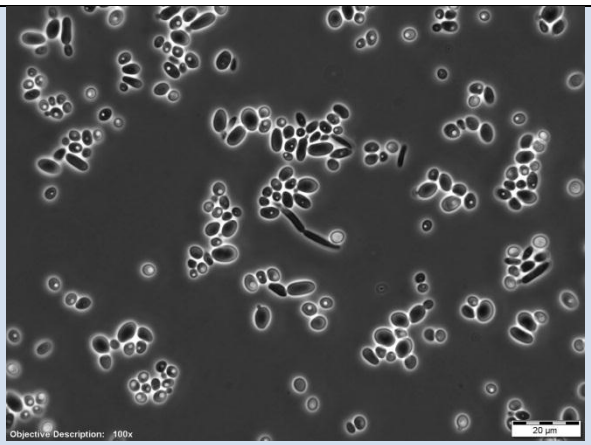
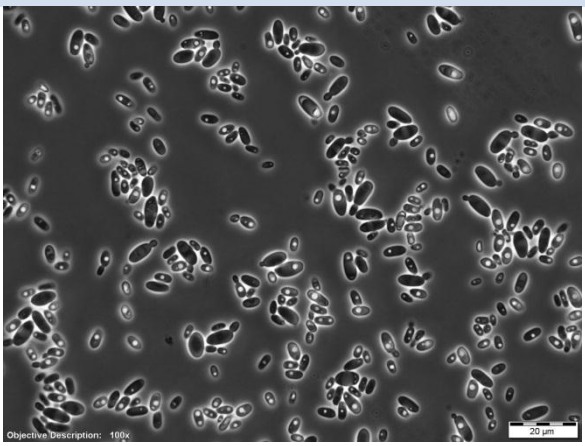
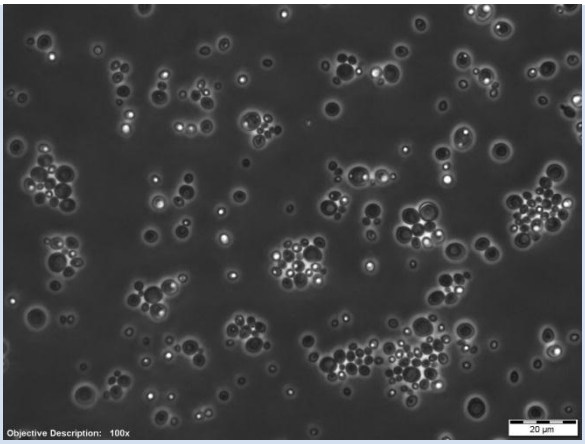
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-033 CLQCA-01-034 CLQCA-10-674	*Hanseniaspora opuntiae*	
CLQCA-01-039 CLQCA-01-040	*Kodamaea ohmeri*	
CLQCA-01-036 CLQCA-01-037 CLQCA-10-690 CLQCA-10-691	*Meyerozyma guilliermondii*	

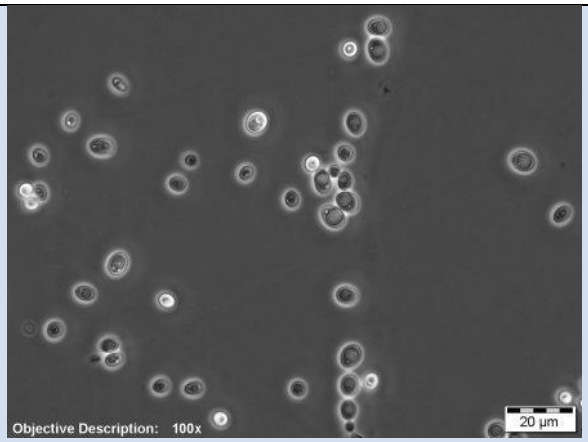
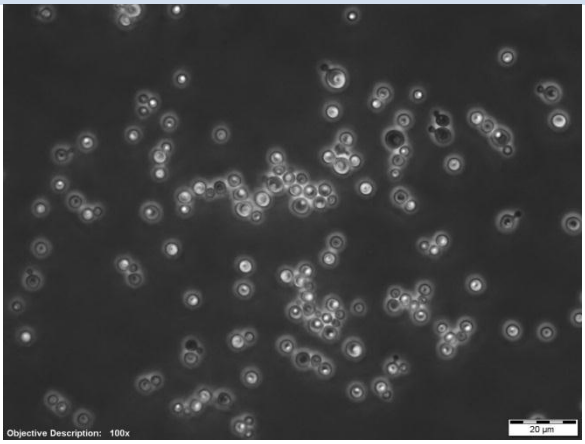
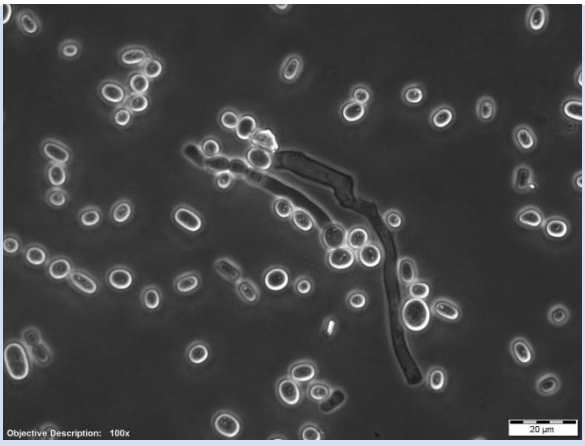
CÓDIGO ASIGNADO		FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-024 CLQCA-01-043	*Pichia kudriavzevii*	
CLQCA-10-687	*Rhodotorula dairenensis*	
CLQCA-10-675	*Saccharomyces cerevisiae*	

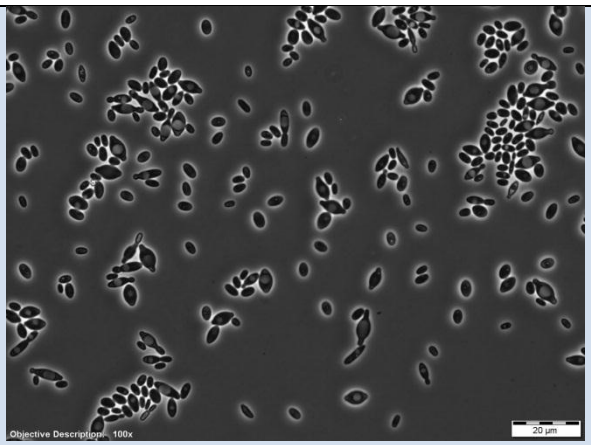
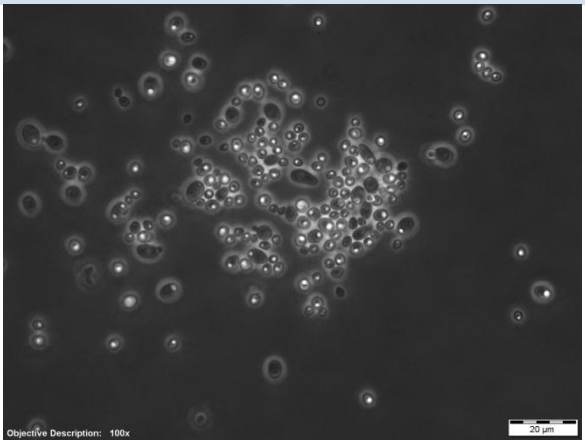
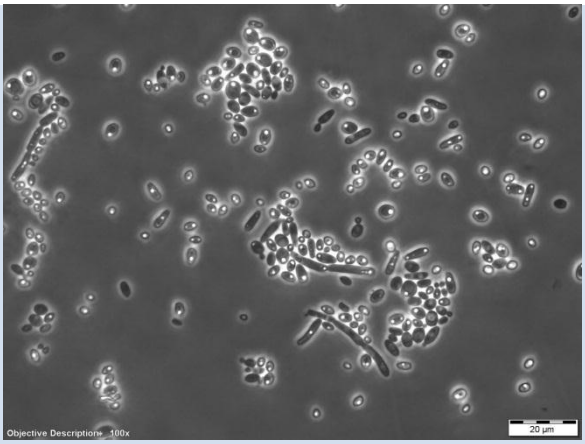
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-10-692	*Trichosporon asahii*	
CLQCA-10-684	*Trichosporon terricola*	
CLQCA-01-026 CLQCA-10-685 CLQCA-10-693	*W. anomalus*	

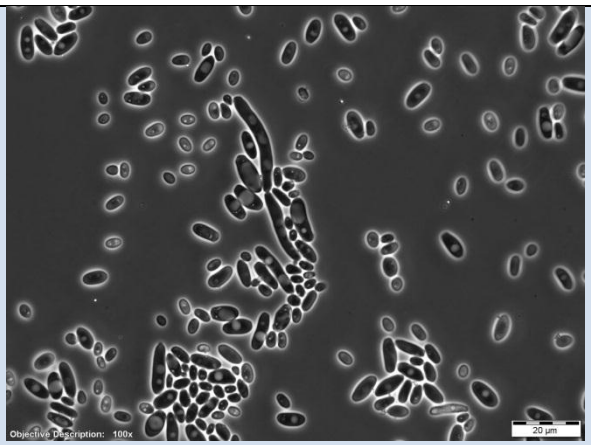
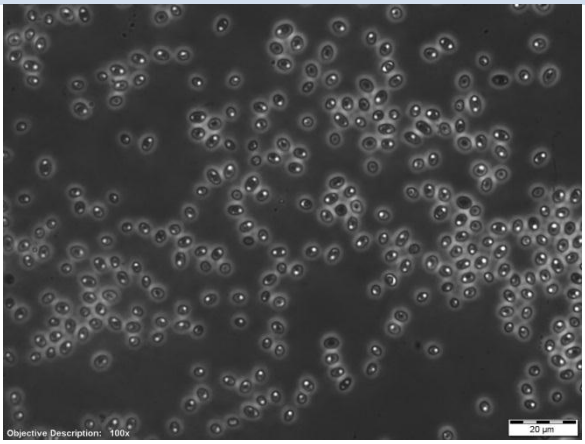
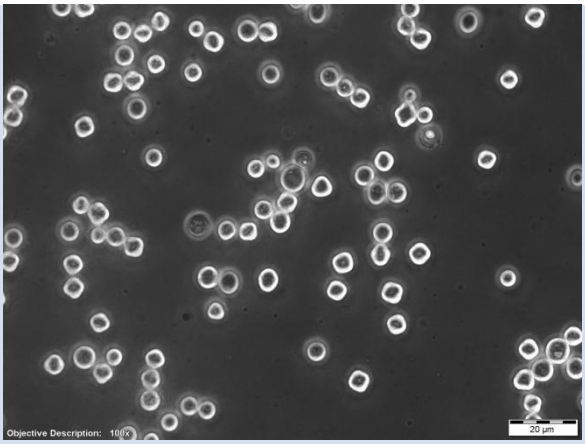
Anexo 6. Fotografías microscópicas de especies de levaduras. Fotografías tomadas después de tres días de incubación en YM agar a 25^{0}C con microscopio de contraste de fase. Aumento 100X

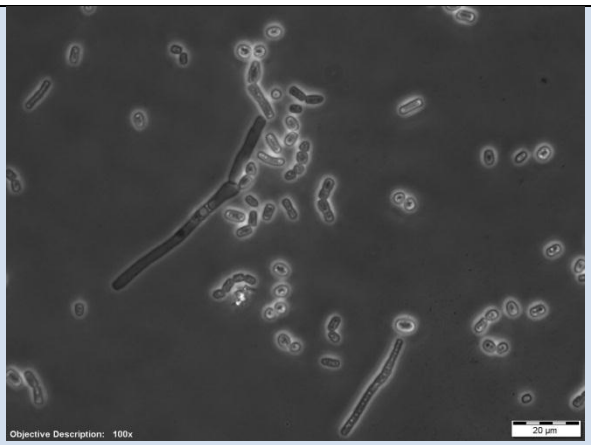
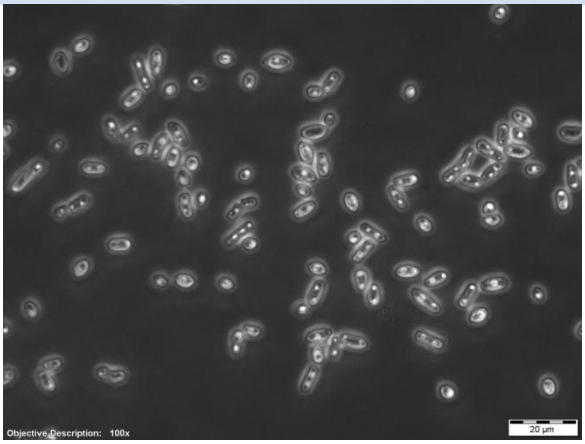
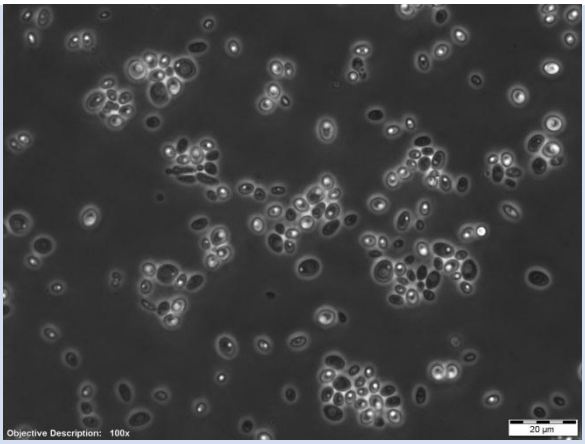
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-027	*Candida albicans*	
CLQCA-01-032 CLQCA-10-673 CLQCA-10-679	*Candida boidinii*	
CLQCA-10-686	*Candida intermedia*	

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-029 CLQCA-01-031 CLQCA-01-038	*Candida orthopsilosis*	
CLQCA-01-028	*Candida sp.*	
CLQCA-01-041	*Candida sp. Bq 26*	

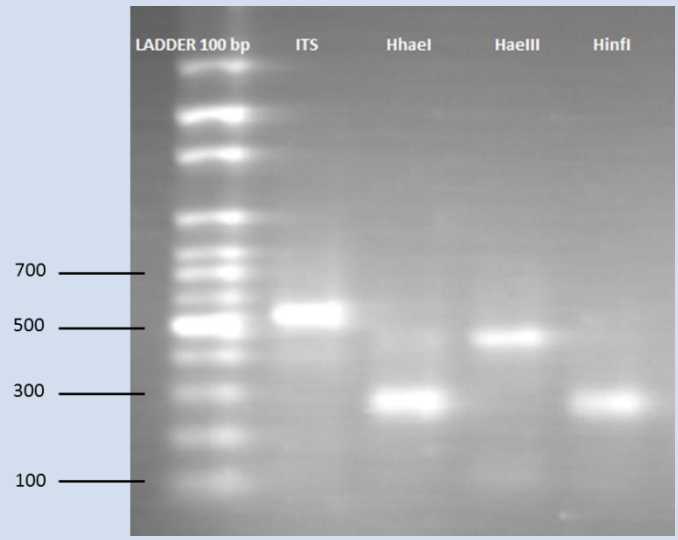
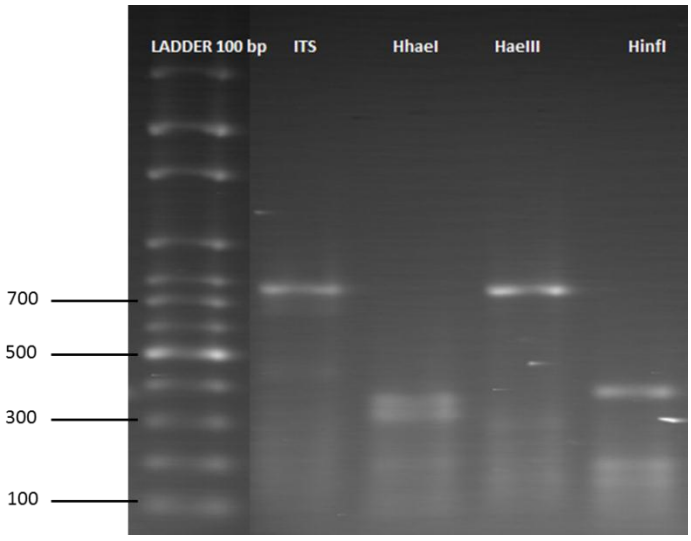
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-023	*Candida tropicalis*	
CLQCA-10-682 CLQCA-10-688 CLQCA-10-689	*Debaryomyces hansenii*	
CLQCA-10-677 CLQCA-10-678 CLQCA-10-680	*Galactomyces candidum*	

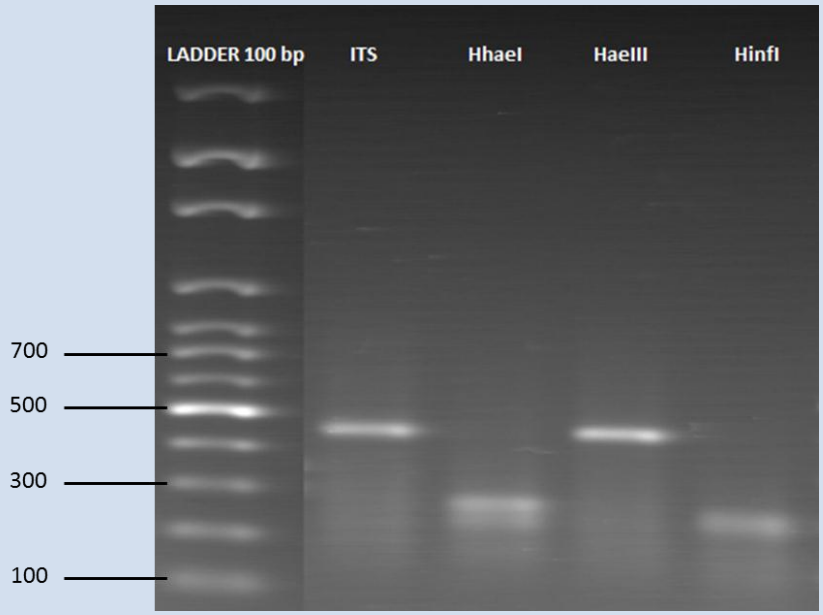
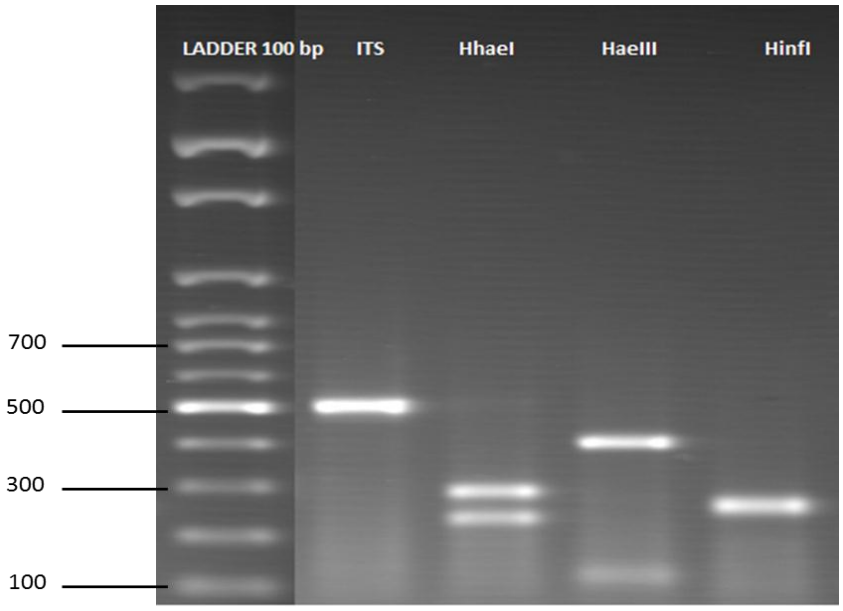
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-033 CLQCA-01-034 CLQCA-10-674	*Hanseniaspora opuntiae*	
CLQCA-01-039 CLQCA-01-040	*Kodamaea ohmeri*	
CLQCA-01-036 CLQCA-01-037 CLQCA-10-690 CLQCA-10-691	*Meyerozyma guilliermondii*	

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-024 CLQCA-01-043	*Pichia kudriavzevii*	
CLQCA-10-687	*Rhodotorula dairenensis*	
CLQCA-10-675	*Saccharomyces cerevisiae*	

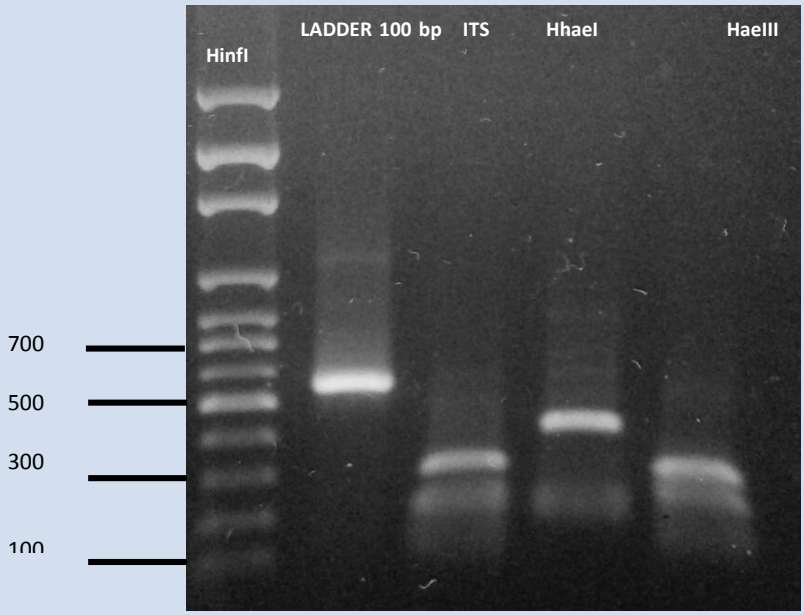
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE	FOTOGRAFÍA
CLQCA-10-692	*Trichosporon asahii*	
CLQCA-10-684	*Trichosporon terricola*	
CLQCA-01-026 CLQCA-10-685 CLQCA-10-693	*W. anomalus*	

Anexo 7. Perfiles de RFLPs-ITS en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio de los productos de PCR y los fragmentos de restricción del 5.8S-ITS de los aislados representativos de las levaduras identificadas.

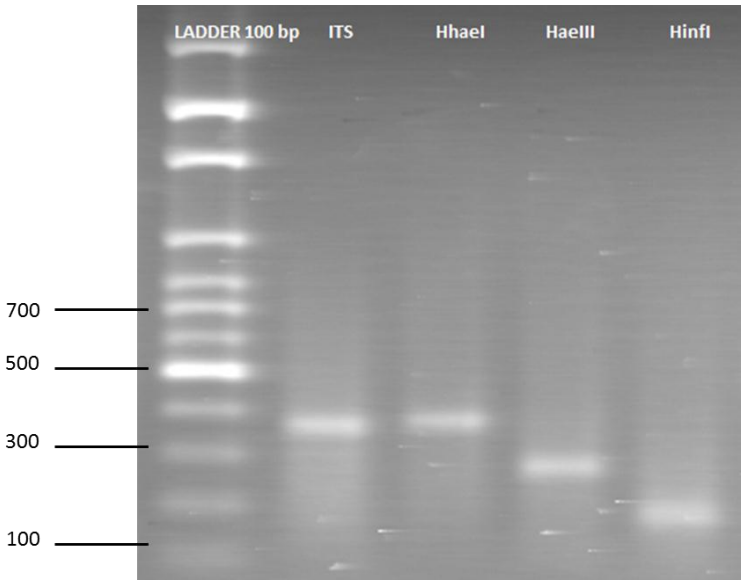
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-027	*Candida albicans* 
CLQCA-01-032 CLQCA-10-673 CLQCA-10-679	*Candida boidinii* 

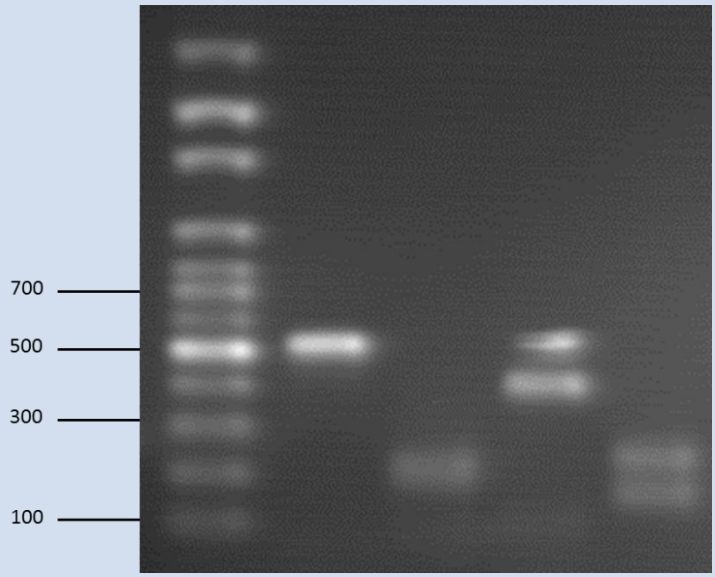
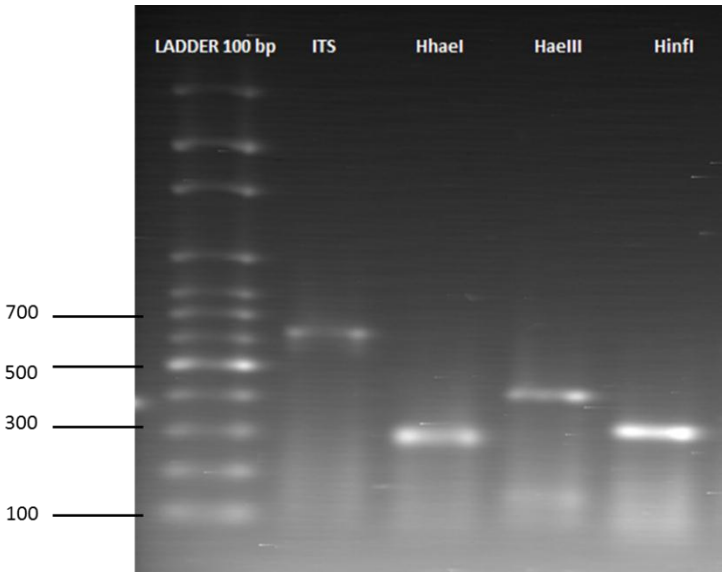
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-10-686	*Candida intermedia* 
CLQCA-01-029 CLQCA-01-031 CLQCA-01-038	*Candida orthopsilosis* 

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-028	*Candida* sp.

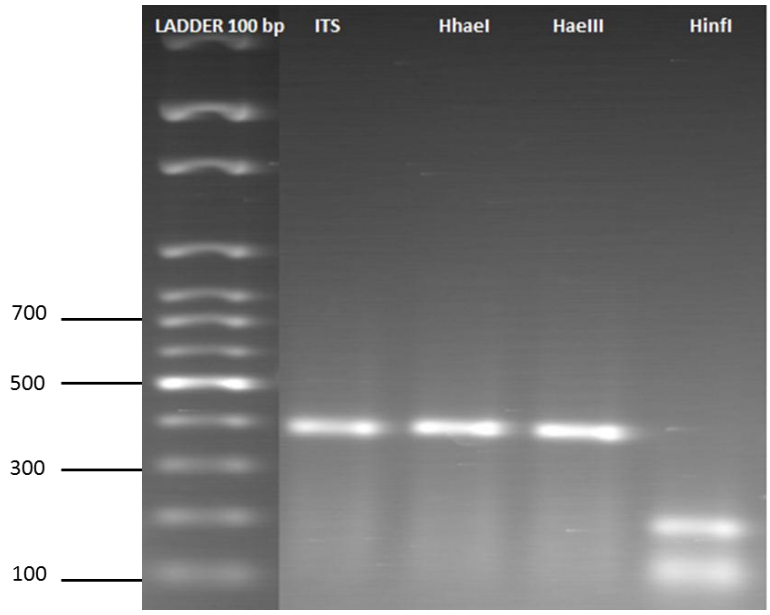
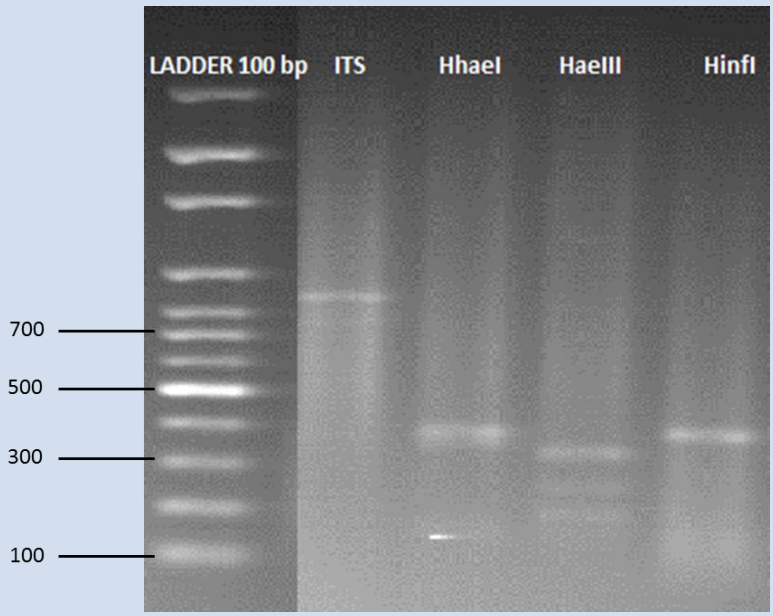


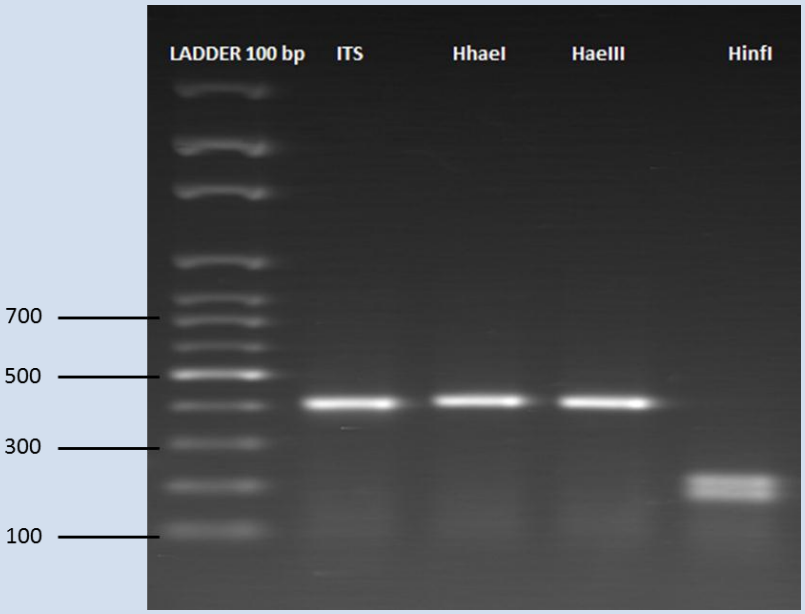
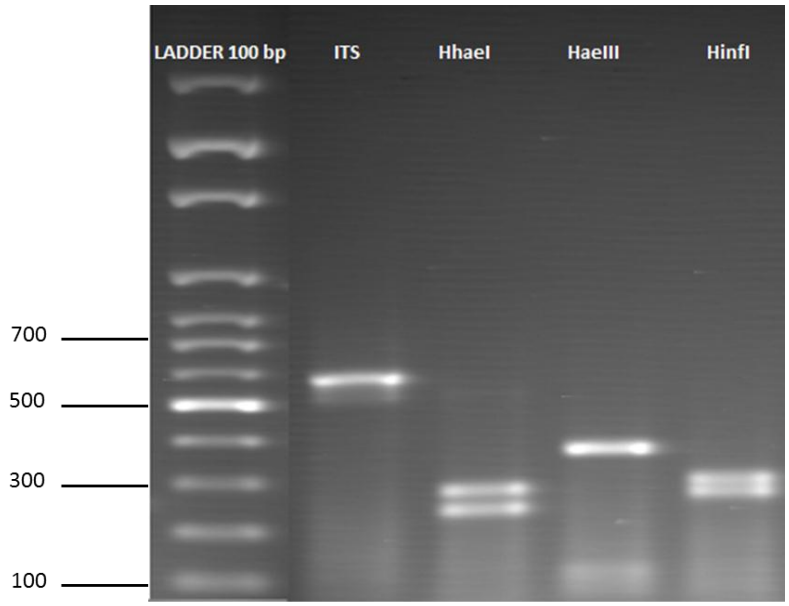
CLQCA-01-041 *Candida* sp. Bq 26

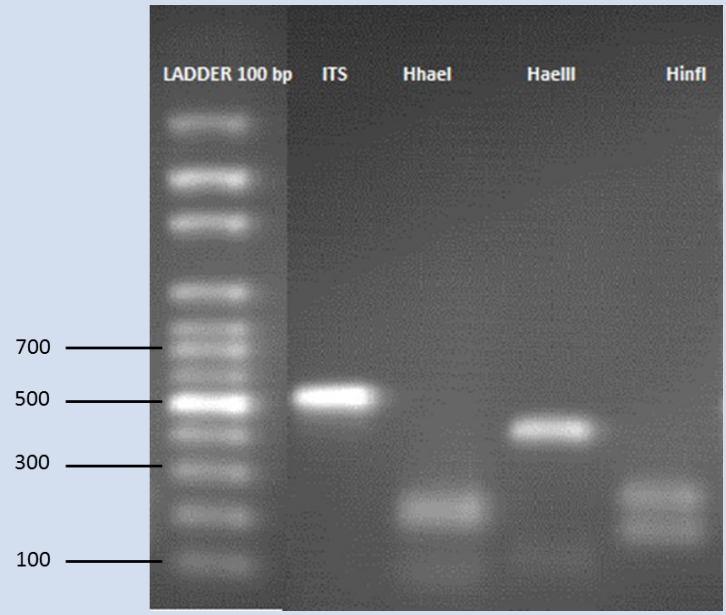
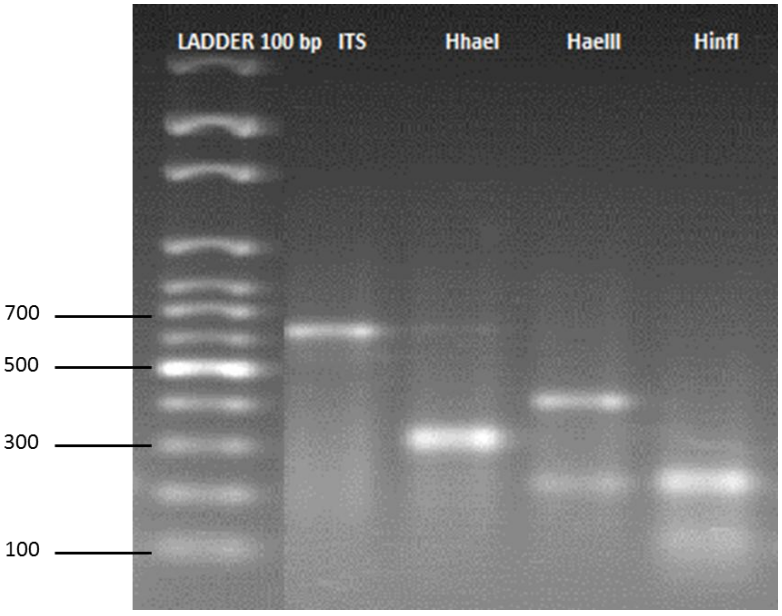


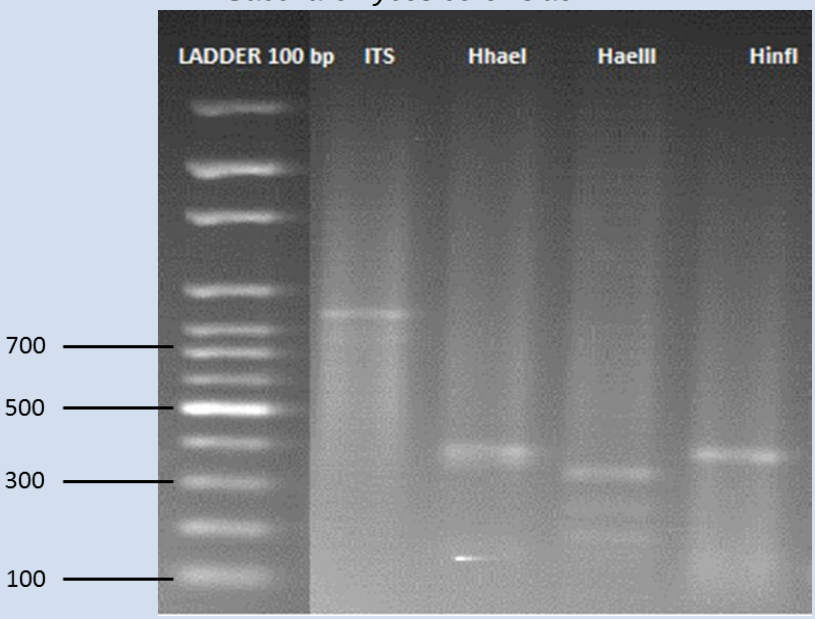
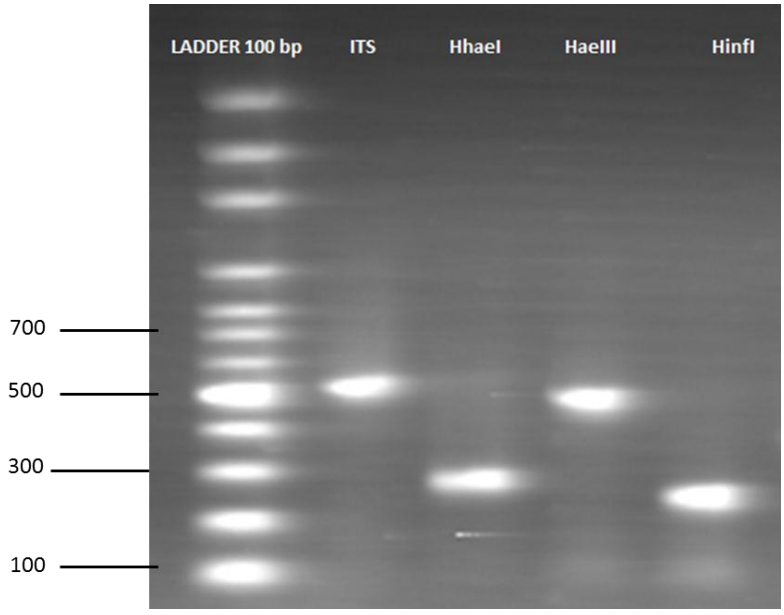
CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-023	*Candida tropicalis* 
CLQCA-10-682 CLQCA-10-688 CLQCA-10-689	*Debaryomyces hansenii* 

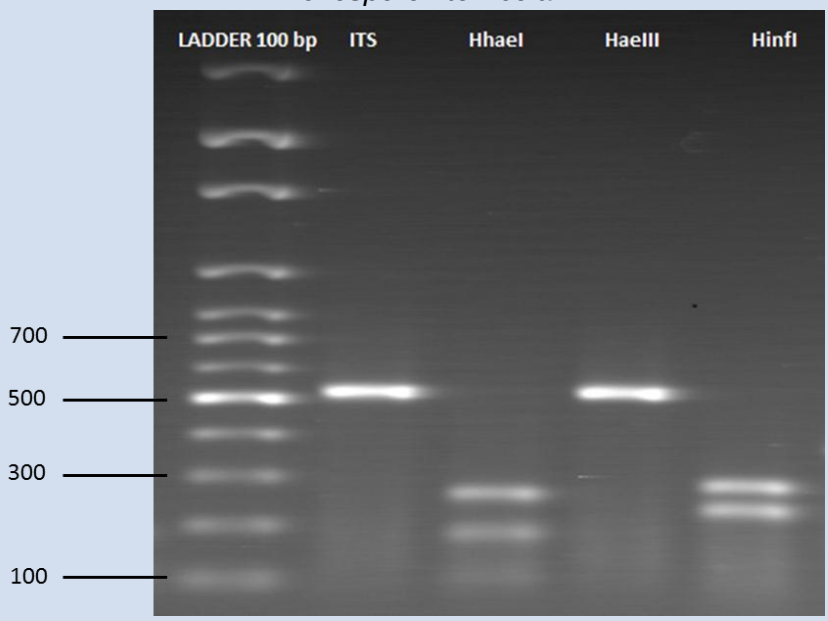
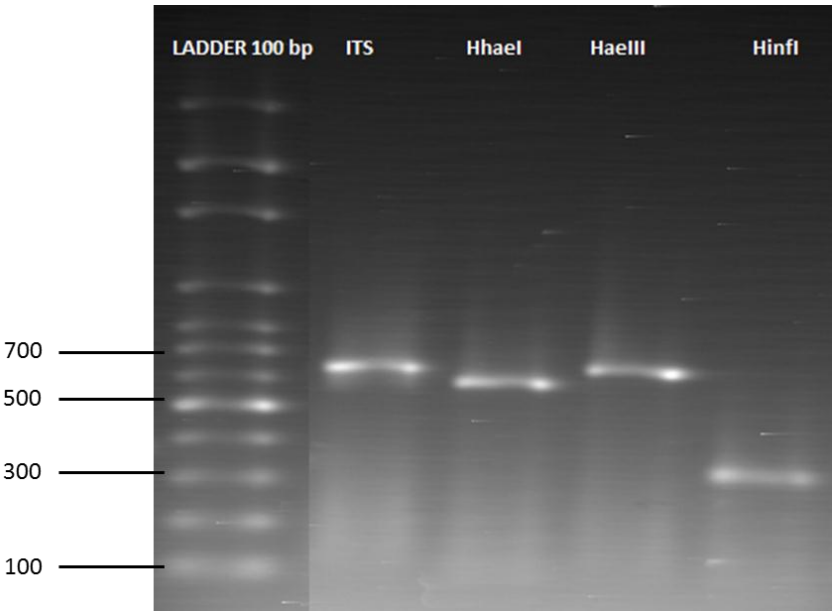
CÓDIGO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA

ASIGNADO	
CLQCA-10-677 CLQCA-10-678 CLQCA-10-680	*Galactomyces candidum* 
CLQCA-10-674 CLQCA-01-033 CLQCA-01-034	*Hanseniaspora opuntiae* 

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-039 CLQCA-01-040	*Kodamaea ohmeri* 
CLQCA-01-036 CLQCA-01-037 CLQCA-10-690 CLQCA-10-691	*Meyerozyma guilliermondii* 

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-01-024 CLQCA-01-043	*Pichia kudriavzevii* 
CLQCA-10-687	*Rhodotorula dairenensis* 

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-10-675	*Saccharomyces cerevisiae* 
CLQCA-10-692	*Trichosporon asahii* 

CÓDIGO ASIGNADO	ESPECIE/FOTOGRAFÍA
CLQCA-10-684	*Trichosporon terrícola* 
CLQCA-01-026 CLQCA-10-685 CLQCA-10-693	*W. anomalus* 

DECLARACION Y AUTORIZACION

Yo, Juan Fernando Lagos Narváez, con C.C. 1719630772, autor del trabajo de graduación titulado: “IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS FERMENTADORAS DE CACAO (T*heobroma cacao*) PROVENIENTES DE CENTROS DE ACOPIO DE DOS LOCALIDADES DEL ECUADOR”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 2 de agosto de 2017

Juan Fernando Lagos Narváez

C.I. 1719630772