



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA

**Trabajo de titulación previo a obtener el grado académico de
Biólogo**

**Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas en la
papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae).**

AUTOR: Harold Eduardo Acosta Anchundia

TUTOR: Blga. Beatriz Pernía Santos, Ph.D.

GUAYAQUIL, ABRIL, 2022

ANEXO XI. – FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN

REPOCITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA			
FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN			
TÍTULO Y SUBTÍTULO:	Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (<i>Carica papaya</i> L., Caricaceae).		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Acosta Anchundia Harold Eduardo		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	Beatriz Pernía Santos		
INSTITUCIÓN:	Universidad de Guayaquil		
UNIDAD/FACULTAD:	Facultad de Ciencias Naturales		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:	Biología		
GRADO OBTENIDO:	Biólogo		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	abril de 2022	No. DE PÁGINAS:	42
ÁREAS TEMÁTICAS:	Desarrollo biotecnológico, conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales.		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Aislamiento, producción, <i>Sporobolomyces</i> sp. levaduras, <i>Lipomyces</i> sp. EPS, biosíntesis.		
RESUMEN:			
Los exopolisacáridos (EPS) son metabolitos secundarios que secretan las levaduras en el medio, para las industrias surgen como nuevas herramientas bases para la elaboración de productos cosméticos, fármacos y alimenticios. Se desconocen que especies son prometedoras para producir EPS y a la vez que sustratos influyen más en la biosíntesis. El objetivo del presente estudio fue aislar levaduras silvestres en la papaya y evaluar que fuente de carbono genera mayor producción de EPS dentro de un Sistema <i>in situ</i>. Como resultado se aisló dos morfotipos de levaduras, posteriormente fueron codificadas de la siguiente manera <i>Sporobolomyces</i> sp. (YAH 001) y <i>Lipomyces</i> sp. (YAH 002). Para ambos aislados se desarrollaron mejor a temperaturas de 25 °C. Se concluye que la papaya (<i>Carica papaya</i>), dispone de una diversidad relativamente baja, debido que ciertos géneros de levaduras son productoras de compuestos polipéptidos, restringiendo así la proliferación de otros grupos levaduriformes. Además, que los sustratos que influyen en mayor medida a la producción de EPS son la fructosa (13,7 g/L) en YAH 001 y para YAH 002 la sacarosa (17,96 g/L). Se demostró que ambas levaduras tienen potencial para producción de EPS a nivel industrial.			

ABSTRACT:

The exopolysaccharides (EPS) are secondary metabolites secreted by yeasts into the environment, and they are emerging as new basic tools for the production of cosmetic, pharmaceutical and food products. It is not known which species are promising for EPS production and which substrates most influence biosynthesis. The objective of the present study was to isolate wild yeasts from papaya and evaluate which carbon source generates more EPS production within an *in situ* system. As a result, two yeast morphotypes were isolated and subsequently coded as follows: *Sporobolomyces* sp. (YAH 001) and *Lipomyces* sp. (YAH 002). For both isolates they developed better at temperatures of 25 °C. It is concluded that papaya (*Carica papaya*) has a relatively low diversity, due to the fact that certain genera of yeasts are producers of polypeptide compounds, thus restricting the proliferation of other yeast groups. Furthermore, the substrates that most influence EPS production are fructose (13.7 g/L) in YAH 001 and sucrose (17.96 g/L) in YAH 002. It was demonstrated that both yeasts have potential for EPS production at the industrial level.

ADJUNTO PDF:	SI	X	NO
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0994495260		E-mail: harold.acostaa@ug.edu.ec
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Universidad de Guayaquil		
	Teléfono: (04) 3080777 - 3080758		
	E-mail: info@fccnngye.com		

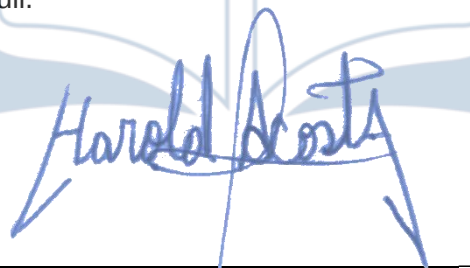
**ANEXO XII. – DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y DE AUTORIZACIÓN DE LICENCIA
GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO COMERCIAL DE LA
OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS**

FACULTAD CIENCIAS NATURALES

CARRERA BIOLOGIA

**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO COMERCIAL DE LA OBRA CON
FINES NO ACADÉMICOS**

Yo, Harold Eduardo Acosta Anchundia con C.I. No. 0950352047, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es “Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae)” son de mi absoluta propiedad y responsabilidad, en conformidad al Artículo. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo la utilización de una licencia gratuita intransferible, para el uso no comercial de la presente obra a favor de la Universidad de Guayaquil.



Harold Eduardo Acosta Anchundia

C.I. 0950352047

ANEXO VII. – CERTIFICADO PORCENTAJE DE SIMILITUD

Habiendo sido nombrado **Beatriz Margarita Pernía Santos, Ph.D.**, tutor del trabajo de titulación certifico que el presente trabajo de titulación ha sido elaborado por **Harold Eduardo Acosta Anchundia**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Biólogo.

Se informa que el trabajo de titulación: Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (Carica papaya L., Caricaceae)., ha sido orientado durante todo el periodo de ejecución en el programa antiplagio URKUND quedando el 1% de coincidencia.



URKUND

Documento	2.0 Tesis Acosta, Harold, Semifinal U.docx (D130908289)
Presentado	2022-03-20 07:03 (-05:00)
Presentado por	dra.beatrizperniasantos@gmail.com
Recibido	dra.beatrizperniasantos.ug@analysis.urkund.com
Mensaje	TESIS HAROLD ACOSTA Mostrar el mensaje completo

1% de estas 12 páginas, se componen de texto presente en 1 fuentes.

<https://secure.urkund.com/old/view/125044720-289604-989335#q1bKLvayija11VEqzkzPy0zLTE7MS05VsjLQMzAwNTcxNDAwsDQyMLG0MDC2qAUA>



BEATRIZ
MARGARITA
PERNIA

Beatriz Margarita Pernía Santos, Ph.D.

TUTOR DE TRABAJO DE
TITULACIÓN

C.I.: 0960050102

FECHA: 20 de marzo de 2022

ANEXO VI. – CERTIFICADO DEL DOCENTE-TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES CARRERA DE BIOLOGÍA

Guayaquil, 20 de marzo de 2022

Sra. Beatriz Pernía, PhD.
DIRECTORA(e) DE LA CARRERA DE
BIOLOGÍA FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES UNIVERSIDAD DE
GUAYAQUIL
Ciudad. -

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación **Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae)**, del estudiante **Harold Eduardo Acosta Anchundia**, indicando que ha cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado del porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que el estudiante **Harold Eduardo Acosta Anchundia** está apto para continuar el proceso de revisión final.

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:

**BEATRIZ
MARGARITA
PERNIA
SANTOS**

Beatriz Margarita Pernía Santos, Ph.D.

TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

C.I.: 0960050102

FECHA: 20 de marzo de 2022

ANEXO VIII. – INFORME DEL DOCENTE REVISOR

**Guayaquil,
SRA. PHD BEATRIZ PERNÍA.
DIRECTORA(e) DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
Ciudad. -**

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la REVISIÓN FINAL del Trabajo de Titulación Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae) del estudiante Harold Eduardo Acosta Anchundia. Las gestiones realizadas me permiten indicar que el trabajo fue revisado considerando todos los parámetros establecidos en las normativas vigentes, en el cumplimiento de los siguientes aspectos:

El título tiene un máximo de 14 palabras.

La memoria escrita se ajusta a la estructura establecida.

El documento se ajusta a las normas de escritura científica seleccionadas por la Facultad. La investigación es pertinente con la línea y sublíneas de investigación de la carrera.

Los soportes teóricos son de máximo 15 años. La propuesta presentada es pertinente.

Cumplimiento con el Reglamento de Régimen Académico:

El trabajo es el resultado de una investigación.

El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.

El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.

El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se indica que fue revisado, el certificado de porcentaje de similitud, la valoración del tutor, así como de las páginas preliminares solicitadas, lo cual indica el que el trabajo de investigación cumple con los requisitos exigidos.

Una vez concluida esta revisión, considero que el estudiante Harold Eduardo Acosta Anchundia está apto para continuar el proceso de titulación. Particular que comunicamos a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:
**JOSE ALCIDES
FLORES CEDENO**

**Blgo, José Alcides Flores
Cedeño MS.c. C.I.:
0913748323
FECHA: 20 de marzo de 2022**

ANEXO XIII.- RESUMEN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN (ESPAÑOL)
FACULTAD CIENCIAS NATURALES CARRERA BIOLOGÍA

“Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae)”

Autor: Harold Eduardo Acosta Anchundia

Tutor: Blga. Beatriz Pernía Santos, Ph.D.

Resumen

Los exopolisacáridos (EPS) son metabolitos secundarios que secretan las levaduras en el medio, para las industrias surgen como nuevas herramientas bases para la elaboración de productos cosméticos, fármacos y alimenticios. Se desconocen que especies son prometedoras para producir EPS y a la vez que sustratos influyen más en la biosíntesis. El objetivo del presente estudio fue aislar levaduras silvestres en la papaya y evaluar que fuente de carbono genera mayor producción de EPS dentro de un Sistema *in situ*. Como resultado se aisló dos morfotipos de levaduras, posteriormente fueron codificadas de la siguiente manera *Sporobolomyces* sp. (YAH 001) y *Lipomyces* sp. (YAH 002). Para ambos aislados se desarrollaron mejor a temperaturas de 25 °C. Se concluye que la papaya (*Carica papaya*), dispone de una diversidad relativamente baja, debido que ciertos géneros de levaduras son productoras de compuestos polipéptidos, restringiendo así la proliferación de otros grupos levaduriformes. Además, que los sustratos que influyen en mayor medida a la producción de EPS son la fructosa (13,7 g/L) en YAH 001 y para YAH 002 la sacarosa (17,96 g/L). Se demostró que ambas levaduras tienen potencial para producción de EPS a nivel industrial.

Palabras claves: Aislamiento, producción, *Sporobolomyces* sp. levaduras, *Lipomyces* sp. EPS, biosíntesis.

ANEXO XIV.- RESUMEN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN (INGLÉS)

FACULTAD CIENCIAS NATURALES CARRERA BIOLOGÍA

“Producción de exopolisacáridos de levaduras silvestres asociadas a la papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae)”

Author: Harold Eduardo Acosta Anchundia

Advisor: Blga. Beatriz Pernía Santos, Ph.D.

Abstract

The exopolysaccharides (EPS) are secondary metabolites secreted by yeasts into the environment, and they are emerging as new basic tools for the production of cosmetic, pharmaceutical and food products. It is not known which species are promising for EPS production and which substrates most influence biosynthesis. The objective of the present study was to isolate wild yeasts from papaya and evaluate which carbon source generates more EPS production within an *in situ* system. As a result, two yeast morphotypes were isolated and subsequently coded as follows: *Sporobolomyces* sp. (YAH 001) and *Lipomyces* sp. (YAH 002). For both isolates they developed better at temperatures of 25 °C. It is concluded that papaya (*Carica papaya*) has a relatively low diversity, due to the fact that certain genera of yeasts are producers of polypeptide compounds, thus restricting the proliferation of other yeast groups. Furthermore, the substrates that most influence EPS production are fructose (13.7 g/L) in YAH 001 and sucrose (17.96 g/L) in YAH 002. It was demonstrated that both yeasts have potential for EPS production at the industrial level.

Keywords: Isolation, production, *Sporobolomyces* sp. yeast, *Lipomyces* sp. EPS, biosynthesis.

DEDICATORIA

A la vida, que me ha regalado momentos buenos y malos, convirtiéndome así en el enemigo más temido de mis debilidades.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios por que me ha guiado para mantenerme firme a mis metas y logros obtenidos.

A mis padres y hermanos que me apoyaron en todo momento, es infinitamente admirable.

Agradezco enormemente a la Universidad de Guayaquil, que conocí el ámbito estudiantil de este nivel académico.

Facultad de Ciencias Naturales y sobre todo a la carrera de Biología, que siempre estaré orgulloso de conocer magníficos profesores que moldearon a mi profesión.

A la Blga Beatriz Pernía que me ayudo incondicionalmente y quien me tuvo mucha paciencia en esta última fase de mi formación, es la mejor.

Al Blgo Xavier Álvarez por su instrucción y apoyo excepcional, fue unos de los pilares base de este estudio.

A mis compañeros del laboratorio, que me ayudaron a realizar este trabajo, se les agradece Ricardo T., Daniela S., Carolina M., Anthony M. y Mafer R.

A la Blga Coello quien intervino en la corrección general de este trabajo.

A mi compañera Karen Muñoz, su compañía me motivo a ser mejor cada día.

Tabla de Contenido

Contenido

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	OBJETIVO ESPECÍFICOS	5
3	Formulación de hipótesis	6
4	ANTECEDENTES.....	7
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1	Aislamiento.....	9
5.2	Pruebas de fermentación oxidativa	10
5.3	Evaluación de la producción de exopolisacáridos	10
5.4	Determinación de Carbohidratos en el sobrenadante por el método de (Dubois et al, 1956).....	11
5.5	Análisis estadístico.....	12
6	Resultados.....	13
6.1	Aislamiento.....	13
6.2	Pruebas de fermentación oxidativa, nitritos, sulfatos y condición térmica	14
6.3	Determinación de EPS	16
6.3.1	EPS influenciado por fructosa.....	17
6.3.2	EPS influenciado por ácidos orgánicos.....	18
6.3.3	EPS influenciado por sacarosa.....	19
6.4	Análisis estadístico.....	20
6.4.1	Varianza estadística en YAH 001	20
6.4.2	Varianza estadística en YAH 002	22
6.4.3	Comparaciones de los sustratos en YAH 002 mediante Tukey	23

7	Discusión	24
8	Conclusiones	28
9	Recomendaciones	29
10	Referencias	30
11	ANEXO	33

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. TIPOS DE HIPÓTESIS	6
TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LEVADURAS AISLADAS.....	13
TABLA 3. RESULTADOS DE LA PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	15
TABLA 4. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UNA VÍA EN YAH 001	20
TABLA 6. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UNA VÍA EN YAH 002	22
TABLA 3. PRODUCCIÓN MÁXIMA DE EPS EN G/L DE LEVADURAS AISLADAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A TRAVÉS DE LEVADURAS	VII
FIGURA 2. PRODUCCIÓN DE EPS POR LAS CEPAS YEAH 001 Y YEAH 002 EN GLUCOSA.....	16
FIGURA 3. PRODUCCIÓN DE EPS POR LAS CEPAS YEAH 001 Y YEAH 002 EN FRUCTOSA	17
FIGURA 4. PRODUCCIÓN DE EPS POR LAS CEPAS YEAH 001 Y YEAH 002 EN ÁCIDOS ORGÁNICOS	18
FIGURA 5. PRODUCCIÓN DE EPS POR LAS CEPAS YEAH 001 Y YEAH 002 EN SACAROSA	19
FIGURA 6. PRUEBA DE NORMALIDAD EN YAH 001 EN GLUCOSA.....	35
FIGURA 7. PRUEBA DE NORMALIDAD EN YAH 001 EN FRUCTOSA.....	36
FIGURA 8. PRUEBA DE NORMALIDAD EN YAH 001 CON ácido CÍTRICO	37
BOOKMARK NOT DEFINED.	
FIGURA 9. PRUEBA DE NORMALIDAD EN YAH 001 CON ACETATO DE SODIO	54
BOOKMARK NOT DEFINED.	
FIGURA 12. DIFERENCIAS EN LA PRUEBA TUKEY	21

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. AISLAMIENTO DE LEVADURAS. A) ESPÉCIMEN YAH 001 EN 10X. B) ESPÉCIMEN YAH 002 EN 10X. C) YAH001 EN MEDIO YPD. D) YAH002 EN MEDIO YPD.....	33
ANEXO 2. FORMULACIÓN DE LAS PRUEBAS DE OXIDACIÓN.....	34

1 INTRODUCCIÓN

Entre los hongos, las levaduras son organismos unicelulares que tienen una reproducción vegetativa por gemación o fisión, incluso se conoce que no forman cuerpos fructíferos en sus estadios sexuales (Walker, 2000). Por ende, al ser un amplio grupo de microorganismo, son cosmopolitas, debido que están presentes en bastos ecosistemas, incluso nos acompañan en nuestro ambiente a diario, ya sea desde la piel de los animales o en el interior de nuestro tracto digestivo; además, se conoce que habitan en el suelo e incluso hasta en las plantas, donde en estas últimas se recalca que en las frutas se consideran como nichos ideales, principalmente en la parte interna del fruto, ya que allí se cumple con los requisitos ambientales para desarrollarse, entre esos se encuentra los nutrientes como azúcares, la humedad y el pH relativamente ácido (Chen, 2016).

El estudio de las levaduras provee una variedad de metabolitos, gracias a esto podemos extraer compuestos de gran importancia, es decir proteínas, alcoholes, ácidos grasos, vitaminas y enzimas, que han servido como materia prima, para la elaboración de múltiples productos industriales, en el ámbito farmacéutico, cosmético y alimenticio. A nivel mundial, las levaduras convencionales son usadas como responsables de la panificación y productos destilares (Hyde, 2019). En el año 2010 se registró en el mercado internacional, que las levaduras abarcaban la suma de aproximadamente $4,5 \times 10^9$ toneladas de biomasa, de las cuales el 60% se empleó para diversos productos alimenticios, un 25% fue resultado de la panificación, un 10% en compuestos derivados en la destilería y finalmente los 5% restantes se empleaban en cervecería (Athnasios, 2012). Otra aplicación actual a nivel biotecnológico en las levaduras son productoras de bioetanol por su simple requerimiento en sacarosa (Figura 1) (Hasunuma, 2014).

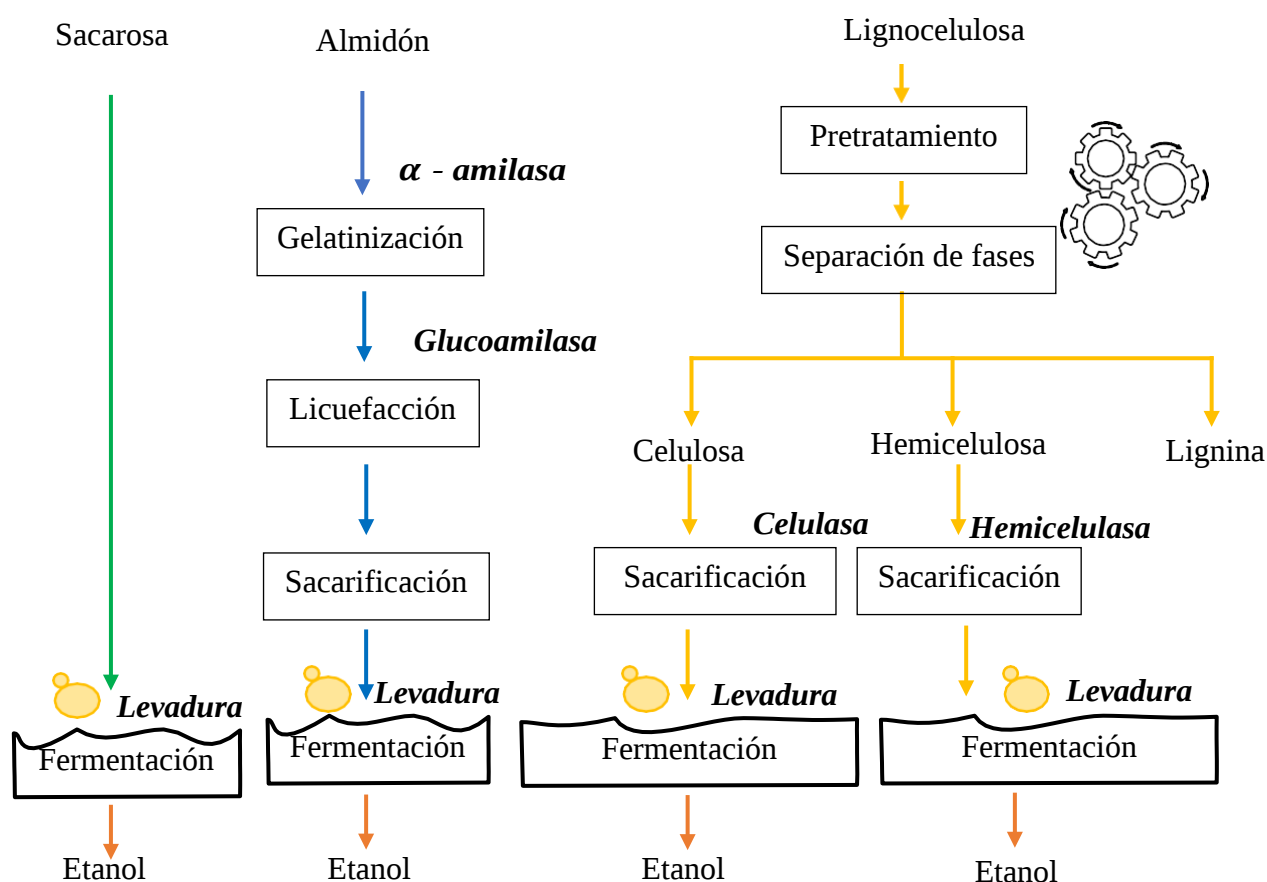


Figura 1. Proceso de producción de bioetanol a través de levaduras.
(Fuente: Elaboración propia, elaborada y adaptada a partir de la publicada por Hasunuma, 2014)

Pero más allá, de estudiar el potencial fisiológico sobre la panificación y fermentaciones alcohólicas, se empieza a investigar nuevas estructuras que secretan las levaduras, unas de esa son los exopolisacáridos (EPS), cuyas propiedades tanto físicas como químicas, muestran una gran utilidad como sustituto de la materia prima de otros productos, extraídos de la biomasa en plantas y algas, reduciendo así la mano de obra, costo y el tiempo de elaboración de dichos productos (Gaviria & Osorio , 2012).

Los EPS son largas cadenas monosacáridos de gran peso molecular, la composición puede ser heterogénea y dependiendo de las condiciones del medio en que se desarrolle puede variar el patrón químico que lo conforma; en las levaduras sirven de adhesión hasta protección contra el estrés biótico y abiótico. Además, las levaduras las usan para prevenir la desecación y depredación, sin embargo en la actualidad los EPS más producidos a nivel comercial son el pululano y el escleroglucano que se utilizan especialmente para aplicaciones en la industria alimentaria y el sector de recuperación de petróleo; consecuentemente se empieza a descubrir sus propiedades bioactivas como compuestos bases de fármacos, por ejemplo, mediante la prevención de mutaciones e infecciones microbianas y para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Melo, 2019).

En Latinoamérica, los descubrimientos sobre estos microorganismos están limitados, ya que generalmente al hablar sobre el aislamiento en levaduras está enfocado sobre el interés clínico, con el objetivo de confirmar su significado patológico; mientras que en la biotecnología, presenta una visión diferente para estudiarlo, a través de su capacidad de fermentar sustratos, es decir, convirtiendo dicho alimento en un producto alterno, generando de esta manera cambios en el sabor, olor y sensación, toda esta combinación es llamada flavor (Mendoza, 2005). A través de la fermentación, se forman los EPS. Además, dentro de la fermentación se producen hasta más de 500 compuestos, de los cuales más de 100 son ésteres (Loviso & Libkind, 2018).

En el Ecuador unos de los frutos que se cosechan y son de mayor importancia en el ámbito de la agricultura son las papayas (*Carica papaya*), que actualmente se han convertido en una fuente económica, debido a sus múltiples presentaciones como fruto, jugos y mermeladas, por su composición bioquímica que se caracteriza al tener nutrientes bioestimulantes y antioxidantes (Lamilla, 2020).

La papaya (*Carica papaya*) es un fruto enriquecido con abundantes polifenoles, que participan en la prevención de infecciones malignas además, poseen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes; todos estos metabolitos y nutrientes pasan por el tracto digestivo donde sufren cambios estructurales, ya sea por fragmentación o rupturas de sus enlaces (Fujita, Tsuno, & Nakayama, 2017). Actualmente se conoce que las levaduras llegan a habitar el interior de las frutas mediante algún vector, es decir, a través de una perforación de ciertos animales, insectos, aves, entre otros (Pons et al., 2019) (Pons, 2019). Pero se desconoce sobre la diversidad de levaduras y el impacto que pueden desarrollar en el interior de esta biomasa vegetal, tomando en cuenta que los estudios micológicos de tipo levaduriformes, presentes en las frutas son muy reducidos en un país megadiverso como Ecuador (Silva, 2007).

Por ende, al estudiar la producción de polisacáridos extracelulares, garantiza la apertura de nuevas investigaciones, como el descubrimiento de nuevas estructuras, nuevos perfiles fisiológicos hasta nuevas especies que compitan con las convencionales (Gientka, 2015).

El objetivo de este estudio fue conocer de manera *In vitro* la capacidad de cuántos EPS puede producir las levaduras aisladas del interior de la papaya (*Carica papaya*), recalcando el impacto que puede generar la fuente de carbono. Algunas de las preguntas de la investigación fueron: ¿Todas las fuentes de carbono producen igual cantidad de EPS? ¿Además de azúcares pueden consumir ácidos orgánicos las levaduras aisladas? ¿Qué carbono es indicado para producir mayor EPS en un sistema controlado? ¿Cuál es la temperatura óptima?

2 OBJETIVOS GENERAL

Evaluar las fuentes de carbono orgánico e inorgánico más eficientes para la producción de exopolisacáridos de las levaduras asociada a la papaya *Carica papaya* L.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Aislar colonias de levaduras presentes en la papaya *Carica papaya* L.
- Examinar cualitativamente la capacidad oxidativa en carbonos, nitrito, azufre y condiciones térmicas óptimas de las levaduras aisladas.
- Identificar las fuentes de carbono (glucosa, ácido cítrico, fructosa, acetato de sodio y sacarosa) que tengan mayor eficacia para producir exopolisacáridos en las levaduras.

3 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

Las fuentes de carbono generan diferentes concentraciones de EPS (Tabla 1)

Tabla 1. Tipos de hipótesis

Hipótesis nula	Todas las fuentes de carbono generan concentraciones de EPS iguales
Hipótesis alterna	Al menos una fuente de carbono no genera concentraciones de EPS iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

4 ANTECEDENTES

Actualmente a nivel mundial existen numerosos estudios, con el fin de identificar levaduras, en el caso de la papaya (*Carica papaya*), demostraron, a través de pruebas moleculares desde regiones del espaciador interno transcrito (ITS) hasta ensayos bioquímicos, la presencia de los géneros de levaduras *Kluyveromyces* y *Pichia* (Bhadra, 2007). Estas cepas respaldan evidencias que solo aparecen en frutos descompuestos debido a que al momento de sembrarlo en otro fruto pero sin estar deteriorado, no logran desarrollarse para formar colonias, surgiendo de esta manera una posible pista sobre diferencias fenotípicas, en esta comunidad levaduriforme (Bhadra, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que las levaduras al sintetizar EPS los secretan en el medio, demostrando que estos compuestos tienen una actividad biológica y se han utilizado como biosurfactante y biofloculantes (Kharat, 2018). En el estudio de Kharat (2018) se descubrió que un espécimen levaduriforme denominado PS1, incluía una mayor actividad antioxidante más una alta eliminación de radicales libres del 95% de efectividad y floculación del 85%, concluyendo que son ideales para el campo industrial enfocado en el ámbito alimenticio y farmacéutico (Kharat, 2018).

Por otro lado, se reporta la aparición de levaduras rojas como *Sporidiobolus*, aislada en salsa de Chile, que en esta especie se caracteriza por su formidable producción de aceite y exopolisacáridos, donde el perfil químico fue descrito por cromatografía líquida, y allí se pudo conocer que estas estructuras están conformadas mayoritariamente de glucano, fosfomanano, manano, glucomanano y galactomanano, indicando que estos compuestos son elementos base en industrias farmacéutica, sin embargo, en lo que más recalca es la importancia de la fuente de carbono que puede implicar, ya que es un factor clave para la biosíntesis de este metabolito (Han, 2018).

En una investigación se estimó la producción de EPS de diferentes levaduras, en donde se determinó que muestran una capacidad de coagregación, mucho más alta para ser utilizadas como probióticos al ser analizadas contra bacterias dañinas como *Staphylococcus aureus* de manera in vitro, donde todas estas cepas silvestres fueron recolectadas de diferentes frutas, verduras, productos lácteos y hasta heces de pollo provenientes de corral (Yildiran, 2019). Además, hay informes donde se menciona que los EPS son de gran peso molecular, con una alta capacidad como biosurfactantes, gelificantes y estabilizadores, ideales para la elaboración de productos cosméticos (Ragavan, 2019).

En síntesis, generalmente se registran metabolitos como manano, galactomano, fosfomano, glucano, D-glucurono y xilomananos, pueden variar la producción de estos polímeros, en Basidiomycota levaduriforme que habitan en el frío, son capaces de producir ácidos grasos insaturados (Hamidi, 2020).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aislamiento

Para el aislamiento de las levaduras, primeramente, se escogió una papaya (*Carica papaya*) en el mercado de Las Orquídeas en Guayaquil, Ecuador. Posteriormente, fue llevada al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, luego se lavó la fruta, una vez limpio se cortó en pedazos, donde se le agregó 100 mL de agua peptonada (1.25% de peso volumen).

Para acelerar el proceso oxidativo de la fruta, se guardó dentro de una bandeja de plástico para eludir alguna contaminación exógena a la fruta, durante una semana se dejó fermentar, una vez finalizado el tiempo se procedió la toma de la muestra, se inoculó en medio PDA agar con antibiótico de cloranfenicol, para evitar la intervención de algún tipo de bacterias. Una vez cultivadas las colonias se las clasificó, según las características macro morfológicas como micro morfológicas, dado esto, se cultivó en medio líquido con 150 mL de PDA, posteriormente se tomó un 1mL de este medio para ser diluido, en tubos de ensayo de 10 mL, para ser mezclado y transferido al siguiente tubo hasta llegar a una dilución de 10^{-4} mL del inóculo inicial. Consecuentemente se describieron las cepas según sus caracteres, tales como color, rasgos macromorfológicos, micromorfológicos y para cada aislado se les asignó un código (Trujillo & Hernández, 2015).

5.2 Pruebas de fermentación oxidativa

Esta prueba bioquímica consiste en detectar la capacidad del hongo de fermentar un sustrato específico. Para ello, se usó tubos de ensayos de tapa rosca con tubos Durham, luego se agregó su respectiva fuente de carbono al 20% en solución con agua peptonada (1.25%), fueron rotulados de la siguiente manera: con glucosa (Glu); almidón (AL); fructosa (FRU); galactosa (Gal); ácido cítrico (AC), lactosa (Lac), sacarosa (SAC), urea (Ur), Melasa (Mel) y acetato de sodio (AN). Posteriormente se pasa a esterilizar en la autoclave, luego se inoculó la muestra en cada tubo una colonia para cada aislado. Al final se examinó los tubos, la aparición de burbujas validó de manera cualitativa la capacidad fermentativa. Igualmente, se hizo este procedimiento con diferentes fuentes de Nitrógeno tales como nitrato de sodio, nitrato de amonio y además, se evaluó la capacidad de asimilar azufre utilizando el sulfato de amonio, todos al 20% y finalmente, se verificó la capacidad adaptativa de las colonias a temperaturas de 25°C y 30°C (Wickerham, 1951).

5.3 Evaluación de la producción de exopolisacáridos

Para determinar la presencia de carbohidratos se usó el método de Dubois et al (Dubois, 1956). Para la evaluación de exopolisacáridos, se realizó un arreglo factorial de 3x3, es decir, tres réplicas y en cada matraz de la solución de 100 mL del medio sometido se realizó un triplicado al momento de medir la absorbancia con el uso del espectrofotómetro. Para el control positivo se usó glucosa del medio sin inocular mostrando un valor de 3 g/L de dicho azúcar. Por otra parte, se elaboró un medio de sales Czapek con ciertas modificaciones:

Medio Czapek

K ₂ HPO ₄	1 gL ⁻¹
KCl	0,5 gL ⁻¹
MgSO ₄ +7H ₂ O	0,5 gL ⁻¹
Peptona.....	12 gL ⁻¹
FeSO ₄ +7H ₂ O.....	0,001 gL ⁻¹

Fuentes de carbono

Glucosa (Control).....	30 gL ⁻¹
Fructosa.....	30 gL ⁻¹
Ácido cítrico.....	32 gL ⁻¹
Acetato de sodio	40,98 gL ⁻¹
Sacarosa.....	30 gL ⁻¹

5.4 Determinación de Carbohidratos en el sobrenadante por el método de (Dubois et al., 1956)

Para los exopolisacáridos disueltos del sobrenadante se utilizó 100 µL de cada muestra por triplicado y se agregó 900 µL de agua destilada (dilución 1/10), se añadió 25µL de fenol al 80%, este reactivo se usa como prueba cualitativa al agregar fenol que genera un cambio de color rojizo ligero indicando reacción positiva de carbohidratos, posteriormente se agitó en el vortex e inmediatamente se combinó con 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado, nuevamente se siguió agitando en el vortex. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 min. En todo el procedimiento se realizó en la cámara extractora de gases. Al final se midió la absorbancia a 485 nm dentro de dos horas; todo este protocolo se evaluó a diario durante una semana.

5.5 Análisis estadístico

Se corroboró la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro – Wilks, y la homocedasticidad con el test de Levene. Para comparar la producción de EPS con los diferentes sustratos se aplicó una ANOVA de una vía y subsiguientemente, se evaluó con la prueba a posteriormente de Tukey. Para este estudio se requirió la intervención de un programa Minitab versión 19.

6 RESULTADOS

6.1 Aislamiento

A partir del interior de la papaya (*Carica papaya*) se aislaron 2 morfotipos levaduriformes, de los cuales YAH 001 presentó características del género *Sporobolomyces*. Sus células presentaron una forma oval con pseudohifas, color salmón o beige y una talla de 2-12 x 3-35 μm ; colonia con un aspecto esponjoso con arrugas; por otro lado, YAH 002 se perfila al taxón de *Lipomyces* sp., que posee una forma globosa o elipsoidal en sus células, con aspecto de la colonia liso, blando sin arrugas y alcanza una talla de 4-9 x 3.5-8 μm (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de levaduras aisladas

Código	YAH 001	YAH 002
Género	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Lipomyces</i>
Forma	Células ovales con pseudohifas	Células de forma globosa o elipsoidales
Talla	2-12 x 3-35 μm	4-9 x 3.5-8 μm
Color	Salmón o beige	Blanco o cremoso
Aspecto de la colonia	Esponjoso con arrugas	Liso sin arrugas y blanda

6.2 Pruebas de fermentación oxidativa, nitritos, sulfatos y condición térmica

En los dos morfotipos hubo oxidación positiva en las siguientes fuentes de carbono: glucosa, fructosa y melasa. Por otro lado, no tuvo actividad en nitratos, sulfato ferroso, galactosa incluso en urea. De igual manera no hubo reacción positiva para lograr desarrollarse a temperaturas de 30°C, revelando de esta manera que los aislados obtenidos no son patógenas para el ser humano, no obstante, al ser sometidas a temperaturas de 25°C se confirma la evidencia para sobrevivir a temperatura ambiente.

Además, la levadura YAH 001 reveló capacidad oxidativa en compuesto del azufre como el sulfato de magnesio, incluso tiende para adecuarse a los ácidos orgánicos como el acetato de sodio y ácido cítrico mientras que el otro espécimen YAH 002 posee la ventaja de consumir sacarosa y almidón (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la Pruebas Bioquímicas.

SUSTRATO	YAH 001	YAH 002
Glucosa	+	+
Fructosa	+	+
Sacarosa	-	+
Ácido cítrico	+	-
Acetato de Sodio	+	-
Sulfato de Magnesio	+	-
Sulfato Ferroso	-	-
Galactosa	-	-
Urea	-	-
Almidón	-	+
Nitrato	-	-
Melasa	+	+
Crecen a 25°C	+	+
Crecen a 30°C	-	-

+ si logra fermentar; - incapaz de fermentar

6.3 Determinación de EPS

La producción de EPS procedentes de los morfotipos se describe a continuación: En el morfotipo YAH 001 generó 12,4 g/L como punto de mayor biosíntesis que se observó en el segundo día del ensayo; en el caso de YAH 002 registró un total de 14,1 g/L durante el día tres; posteriormente ambos aislados mermaron su producción conforme aumenta el tiempo, es probable que se agotará la fuente de carbono en aquel instante.

Se observó la influencia de la glucosa, revelando una similitud en los primeros días para los aislados, sin embargo, para la producción de ambos mostró diferencias significativas en los picos, esto indicó una efímera formación de EPS, manifestando así, que en YAH 001 logró obtener menor biosíntesis, posteriormente, tras alcanzar a su punto máximo decae de manera exponencial, mientras que en YAH 002 muestra un crecimiento mayor al del otro espécimen, a pesar de que ambos disminuyeron la producción, durante el ensayo (Figura 2).

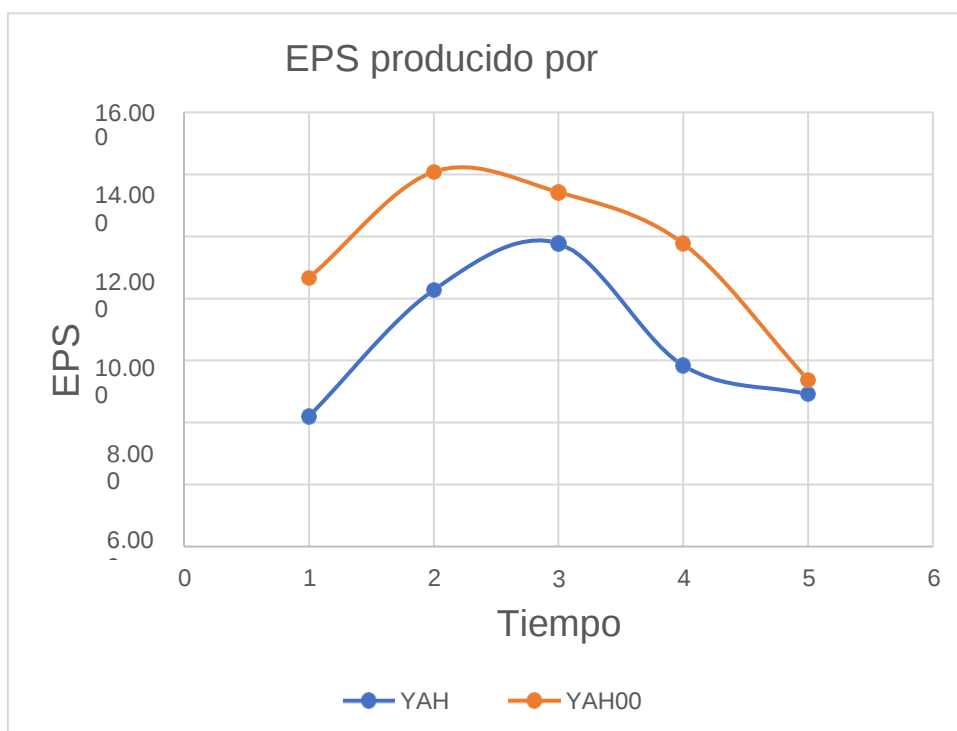


Figura 2. Producción de EPS por las cepas YEAH 001 y YEAH 002 en glucosa

6.3.1 EPS influenciado por fructosa

El morfotipo YAH 001 al inicio generó 4,4 g/L de EPS y conforme avanzó el tiempo alcanzó su máxima producción de 13,7 g/L, consecutivamente, la concentración descendió súbitamente. Por otro lado, en YAH 002 de igual manera, parte con un valor de 11,2 g/L en el día 1 y aumentó a 14,1 g/L al segundo día hasta llegara a su clímax de 14,6 g/L del día tres, de allí en adelante comenzó a disminuir constantemente la concentración de dicha macromolécula (Figura 3).

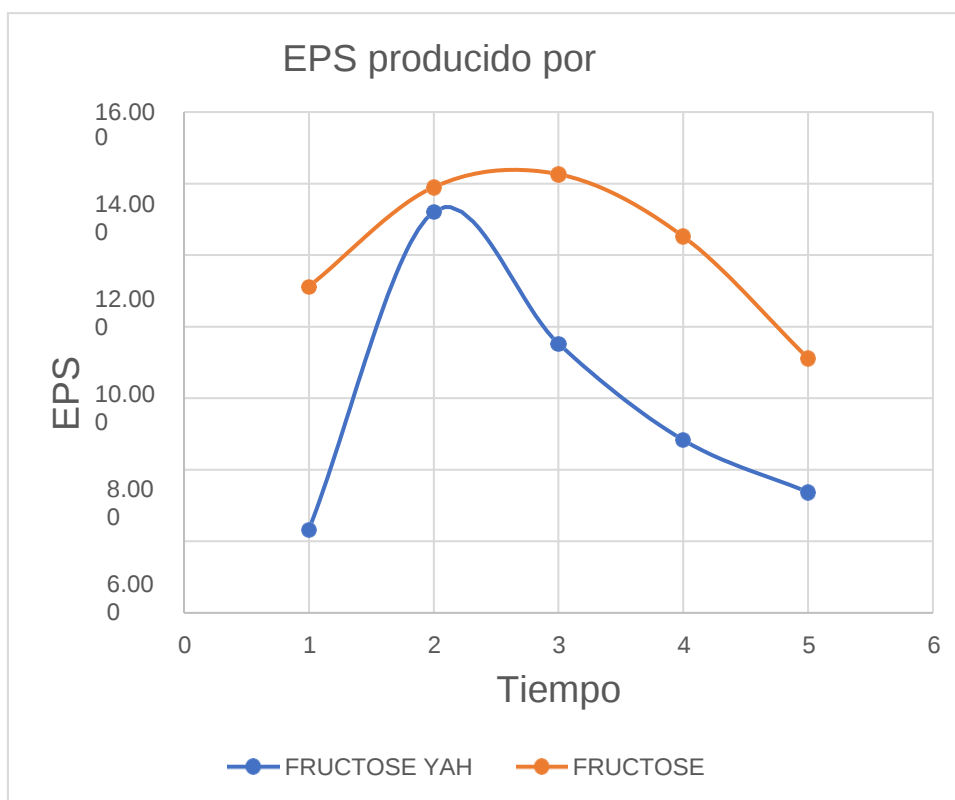


Figura 3. Producción de EPS por las cepas YEAH 001 y YEAH 002 en fructosa

6.3.2 EPS influenciado por ácidos orgánicos

En YAH 001 sintetizó 7,6 g/L de EPS el quinto día de exposición a ácido cítrico, por otro lado, con el acetato de sodio se generó 3,6 g/L al final del ensayo; peculiarmente estos datos obtenidos, mostraron un aumento de manera lineal, dejando sin evidencias la formación de picos como otros sustratos, esta manifestación revela que la participación de los ácidos orgánicos genera cambios menos efímeros en la concentración de los EPS; sin embargo, se recalca que el morfotipo YAH 002 desde un principio fue incapaz de asimilar estas fuentes de carbono (Figura 4).

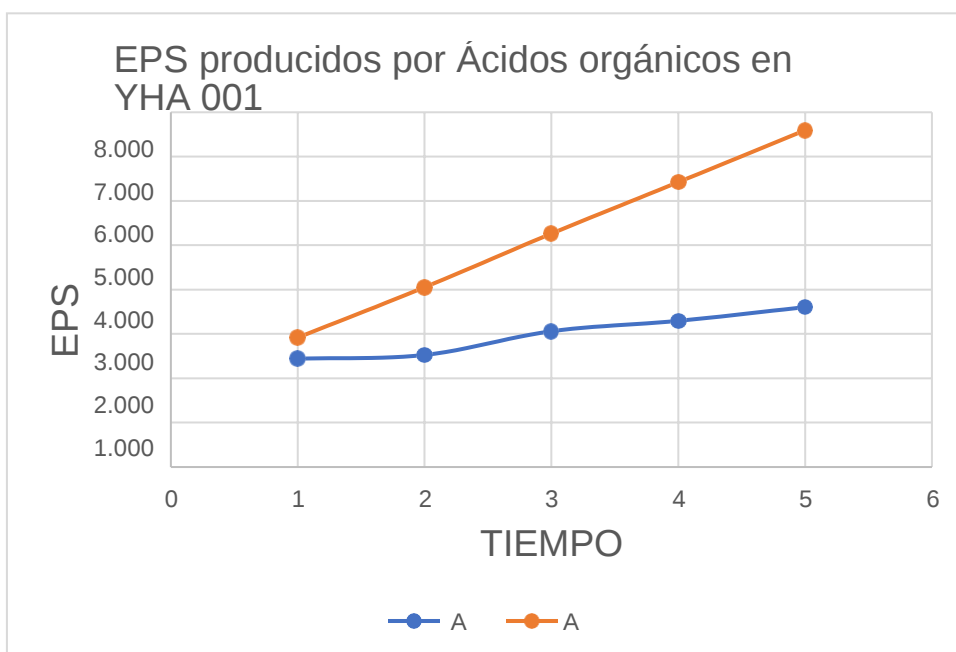


Figura 4. Producción de EPS por el morfotipo YEAH 001 y YEAH 002 en ácidos orgánicos; AN: Acetato de sodio; AC: Ácido cítrico.

6.3.3 EPS influenciado por sacarosa

El morfotipo YAH 002 al comienzo del experimento generó 11,6 g/L de EPS, posteriormente, el concentrado aumento a 12,7 g/L, al día siguiente con 18,4 g/L como carga máxima al día 3, desde allí la producción empezó de reducir paulatinamente, es decir a 15,8 g/L y finaliza en 13 g/L, indicando de esta manera la formación de dicho metabolito que consecuentemente se despolimeriza ante una respuesta biológica (Figura 5).

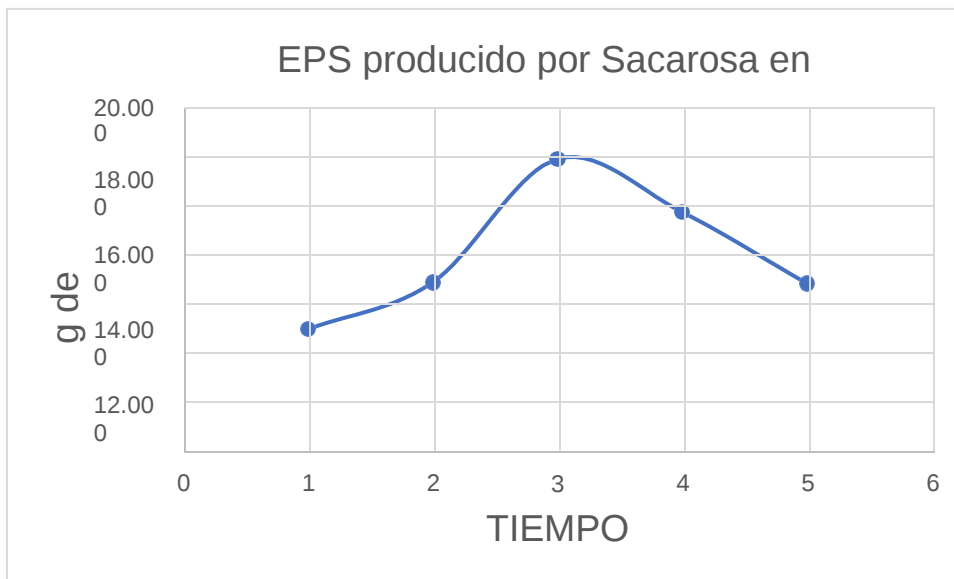


Figura 5. Producción de EPS por las cepas YAH 002 en sacarosa.

6.4 Análisis estadístico

6.4.1 Varianza estadística en YAH 001

Con la finalidad de comparar la concentración de EPS utilizando los diferentes sustratos se aplicó una prueba de análisis de varianza de una vía y se determinó que los tratamientos generaron diferentes concentraciones de EPS, con un valor de F de 1418,05 y un valor de P de 0,001 como indica en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de Varianza de una vía en YAH 001

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Factor	3	173,684	57,8945	1418,05	0,001
Error	8	0,327	0,0408		
Total	11	174,01			

Comparaciones de los sustratos en YAH 001 mediante Tukey

En general, se comprobó que la fructosa fue el sustrato que influyó en mayor medida en la biosíntesis de los EPS, con una media de $13,7 \pm 0,006$ g/L; posteriormente la dextrosa con $12 \pm 0,4$ g/L; seguido por el ácido cítrico con $7,6 \pm 0,01$ g/L y al final el aceto de sodio $3,6 \pm 0,004$ g/L (Figura 6).

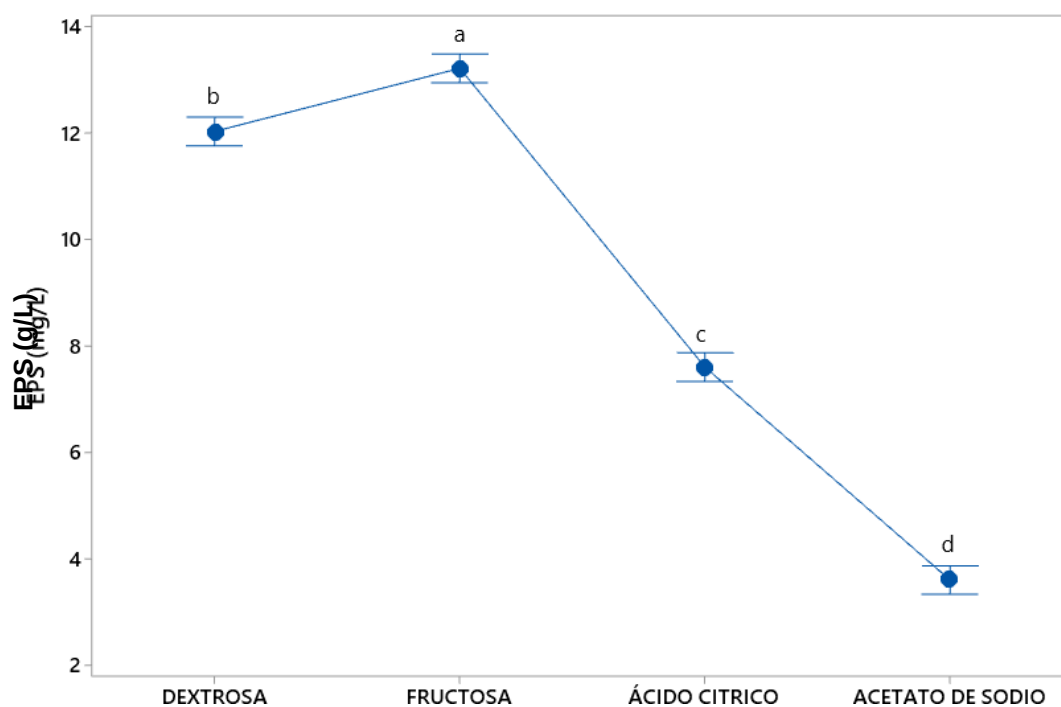


Figura 6. Concentraciones de EPS en los diferentes sustratos. Letras diferentes indican variaciones significativas según anova de una vía y test de Tukey.

6.4.2 Varianza estadística en YAH 002

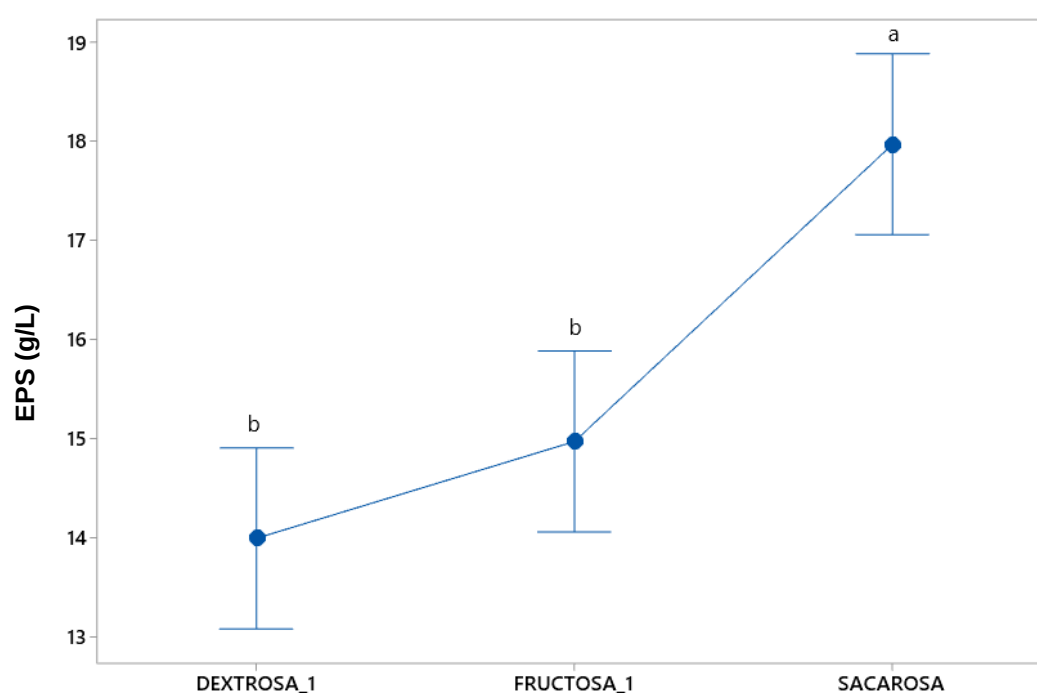
Al igual que el anterior aislado, se comprobó que la concentración de EPS varían dependiendo del sustrato según el análisis de varianza de una vía, con un valor F de 30,81 y P 0,001 como indica en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 5. Análisis de Varianza de una vía en YAH 002

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Factor	2	25,716	12,8582	30,81	0,001
Error	6	2,504	0,4174		
Total	8	28,221			

6.4.3 Comparaciones de los sustratos en YAH 002 mediante Tukey

De los tres sustratos bases para producir EPS, la sacarosa fue la más eficiente con una producción de $17,96 \pm 0,45$ g/L, esta ventaja se debe por la sacarosa que esta compuesta de glucosa y fructuosa, es por ello que la actividad metabólica del microorganismo es mejor; en segundo lugar, la fructosa con un rendimiento de $14,96 \pm 1,01$ g/L y al final la glucosa promediando un valor de $13,99 \pm 0,16$ g/L.



7 DISCUSIÓN

Se aislaron dos cepas de levaduras en la papaya en Ecuador: *Lipomyces* sp. y *Sporobolomyces* sp. Al igual en el presente estudio, Bhadra (2007) encontró en la papaya dos levaduras *Kluyveromyces* sp. y *Pichia* sp., sin embargo, las especies son diferentes probablemente debido a que la investigación se realizó en la ciudad de Hyderabad, India.

Con respecto al género *Lipomyces* sp. es de amplia distribución, capaz de desarrollarse en frutas, en hojas y entre otros sustratos. Varía en la disponibilidad de recursos y es uno de los pocos ejemplares de levaduras que consume almidón, pero de preferencia prosperan en frutos descompuestos. Por otro lado, *Sporobolomyces* se caracteriza por su llamativa coloración naranja parecida *Rhodotorula*, y se ha descrito su desarrollo en granos. Se concluye que la papaya (*Carica papaya*), dispone de una diversidad baja de levaduras, y podría deberse a que ciertos géneros de levaduras productoras de compuestos polipéptidos, que restringen la proliferación de otros grupos levaduriformes, o a la capacidad de la papaya de sintetizar metabolitos antifúngicos (Hamidi, 2020).

Al igual que en el presente estudio se aislaron dos morfotipos de levaduras, en el trabajo de Kharat (2018) quien aisló en otras frutas dos morfotipos de levaduras, cuyos especímenes fueron codificados como SP1 y SP2, no obstante, al evaluar las condiciones térmicas, se descubrió que los aislados presentaban adaptabilidad a temperaturas de 25°C, 30°C y 35°C, mientras que *Lipomyces* y *Sporobolomyces* crecieron hasta 25°C indicando de esta manera, una divergencia entre las levaduras aisladas por Kharat y las del presente trabajo.

En cuanto a la capacidad oxidativa de los sustratos, el estudio que realizó Bhadra (2007), converge con la investigación presente en dos puntos de vista, la primera es que las levaduras eran capaces de oxidar glucosa y fructosa; en el segundo punto reveló que los aislados coinciden en la falta de capacidad para utilizar lactosa y nitratos; esta incapacidad podría deberse a que el fruto de la papaya (*Carica papaya*) no contiene estos sustratos.

Por otro lado, la síntesis de EPS levaduriforme, está relacionado con un ambiente de cultivo específico, en donde se tomó en cuenta la máxima producción de este metabolito y sus variables, en esta prueba se comparó la fuente de carbono, ya que es el factor principal para la elaboración de los EPS. Por ende, en este estudio se indagó que carbono fue más apropiado para producir mayor cantidad de exopolisacáridos. El sustrato que generó mayor concentración de EPS en el aislado YAH 001 fue la fructosa con 13,7 g/L y en YAH 002 sobresalió la sacarosa con 17,96 g/L.

Con respecto a las fuentes de carbono, otros investigadores han utilizado otras fuentes como macerado de maíz y extracto de levadura que podrían probarse a futuro con las especies *Lipomyces* sp. y *Sporobolomyces* sp. Han (2018), probó estos sustratos con la levadura *S. pararoseus* generando 7,4 g/L de EPS con macerado de maíz y con extracto de levadura 7,4 g/L, mayores a las conseguidas con el control positivo glucosa (6,8 g/L).

Al hablar del concentrado de carbono con la presente investigación, todos los sustratos se establecieron al 3%, incluyendo la fructosa y sacarosa. Por el contrario, para Kharat (2018) sus aislados SP1 & SP2 demostraron mayor influencia de biosíntesis usando glucosa (6%), para ambos especímenes produjeron 2 g/L de EPS, no obstante, al mencionar sobre la condición térmica optimizada fue del 30°C; lo peculiar de estos resultados relativamente bajos, fueron las variables que determinó dicho autor, debido que las fuentes de carbono que dispuso a experimentar (glucosa, fructosa y sacarosa), cada una con sus respectivas concentrados (2%, 6%, 8%).

En el caso de Ragavan (2019) obtuvo menores valores al suplementar con sacarosa obteniendo 4,86 g/L de EPS, esta eventualidad es debida por la insuficiente concentración de sustrato que aplicó durante su evaluación (2%), los demás factores convergen en temperatura (25 °C) y la fuente de nitrógeno (peptona). Por otro lado, al incrementar la disponibilidad de carbono orgánico en el medio, mayor será la biosíntesis de EPS, eso concuerda con la investigación realizada por Hamidi (2020), quién validó que al usar sacarosa se obtiene 28,5 g/L de EPS, sin embargo, se evidenció claramente que la mayor ventaja fue al aislar una especie del género *Rhodotorula*, adicionalmente se estima que a mayor temperatura, dentro del límite fisiológico de su aislado podría ser mayor la biosíntesis de EPS en su ensayo, para esta anomalía la condición térmica que realizó fue a bajas temperaturas (6° C).

Comparativamente, la levadura que ha generado menor concentración de EPS fue *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados que obtuvo Yildiran (2019), difieren de manera atípica del presente estudio, ya que aislaron la especie *S. cerevisiae* que solo generó ante la exposición a glucosa y temperaturas de 30°C 0,27 g/L de EPS, inferior a los estudios anteriores mencionados y al presente.

Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento para ambas levaduras fue 25°C. La condición térmica es un factor a considerar, en el cual se evidenció una limitación fisiológica para el desarrollo de los hongos a temperaturas mayores a 25°C. De la misma manera la fuente de nitrógeno para este estudio fue la peptona.

Dentro de las limitaciones del presente estudio, se distingue una ausencia de los datos obtenidos durante la síntesis de EPS y la optimización del porcentaje de los diferentes sustratos. También se propone para futuras investigaciones probar otros sustratos como macerado de maíz y extracto de levadura para incrementar la síntesis de EPS.

Finalmente queda demostrado el potencial de las cepas de *Lipomyces* sp. y *Sporobolomyces* sp para generar EPS a nivel industrial a una temperatura no mayor a 25°C, donde se puede probar su acción como gomas, espesantes, aislantes e incluso como medicamentos.

8 CONCLUSIONES

Se aislaron dos cepas de levaduras en la papaya *Sporobolomyces* sp. (YAH 001) y *Lipomyces* sp. (YAH 002). Los dos morfotipos aislados, lograron su mayor síntesis de EPS en los días 3 y 2, respectivamente.

Los mejores sustratos para producir EPS, fueron la fructosa y la sacarosa en el presente estudio. La temperatura óptima fue de 25 °C tomando en cuenta que las mejores condiciones para obtener la mayor síntesis de este metabolito.

Se finaliza que las levaduras capturadas tienen una producción de EPS prometedora para ser requerida en las industrias, no obstante, no son viable para ser empleadas en un sistema mayor de 25 °C al igual en el caso para uso de probióticos.

9 RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar mayores estudios de EPS al momento de evaluar sobre la implicación que puede generar la fuente de nitrógeno, mostrando cierta similitud con los datos obtenidos o temas adyacentes.

Además, se propone evaluar otros ácidos orgánicos como fuentes de carbono en la producción EPS y sus posibles impactos que podría cambiar el perfil químico de estos metabolitos.

Se propone indagar la diversidad de levaduras en frutas en descomposición con otras que estén en buen estado, debido que ciertas levaduras sintetizan polipéptidos tóxicos que inhiben el crecimiento de otras representantes del mismo género.

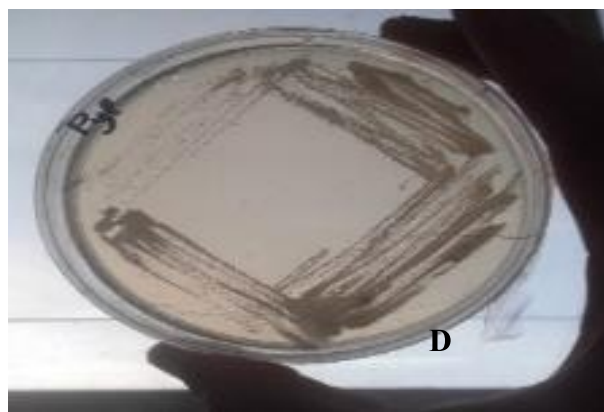
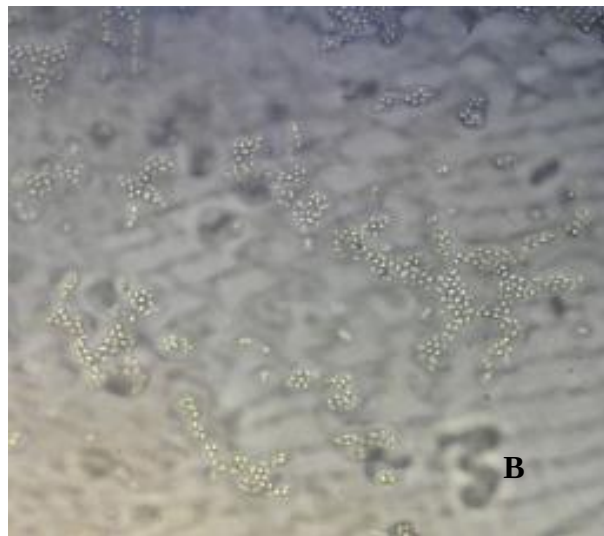
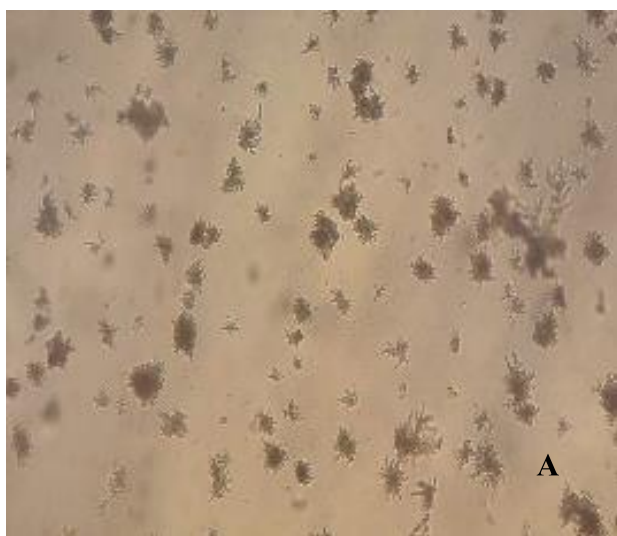
10 REFERENCIAS

- Athnasios. (2012). Yeasts. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
doi:doi:10.1002/14356007.a28_461.pub2
- Bhadra. (2007). *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit
(*Carica papaya* L., Caricaceae). *FEMS yeast research*, 7(4), 579-584. .
- Chen. (2016). Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts
from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides.
International Journal of Dairy Technology, 410-417.
- Dubois. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related
substances. *Anal. Chem*, 28 pp 350–356.
- Fujita, Tsuno, & Nakayama. (2017). Fermented papaya preparation restores
age-related reductions in peripheral blood mononuclear cell cytolytic
activity in tube-fed patients. . *PloS one*, 12(1), e0169240.
- Gaviria, & Osorio . (2012). Diversidad de levaduras asociadas a inflorescencias
de mango y flores de “lulo arbóreo”. *Biotecnología en el Sector
Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 160-169.
- Gientka. (2015). Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions
for biosynthesis, chemical composition and functional properties? *Acta
Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(4), 2.
- Hamidi. (2020). Production, characterization and biological activities of
exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula
mucilaginosa* sp. GUMS16. *International journal of biological
macromolecules*, 151. pp 268-277.
- Han. (2018). Co-production of microbial oil and exopolysaccharide by the
oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus* grown in fed-batch culture.
RSC advances, CAP:8(6). pp 3348-3356.
- Hasunuma. (2014). Ethanol production from yeasts. En *Bioprocessing of
Renewable Resources to Commodity Bioproducts* (págs. 201-226.).
- Hyde, K. X. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit
fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97(1), 1-136.

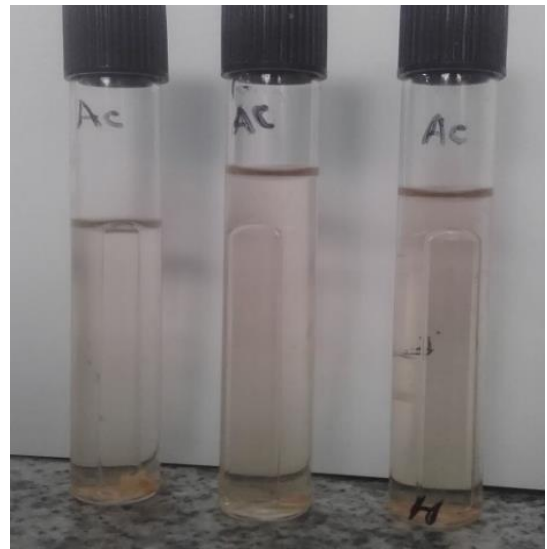
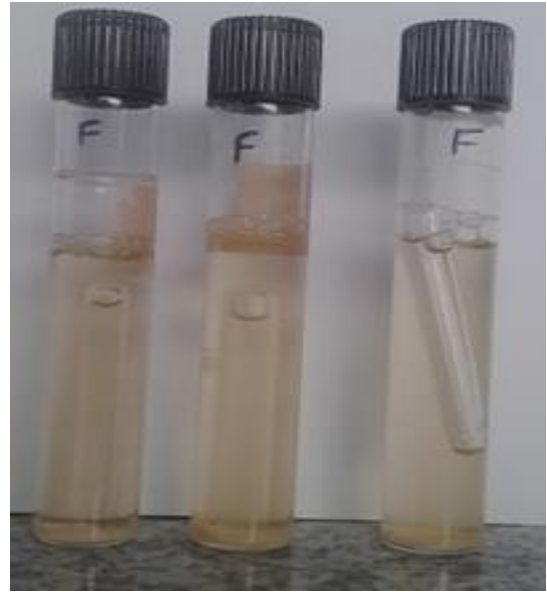
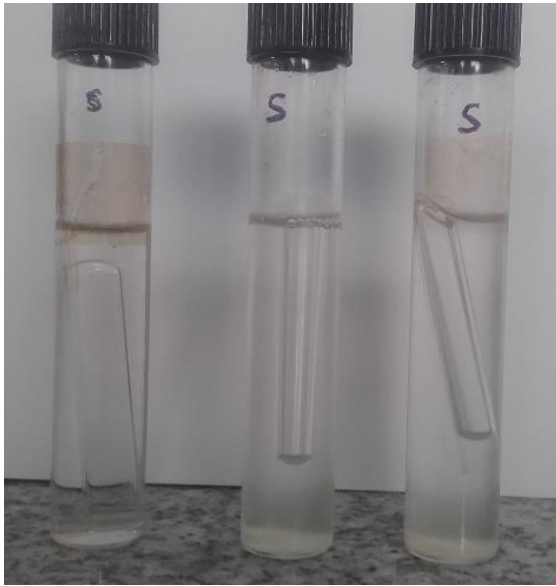
- Kharat. (2018). Isolation and Characterization of Exopolysaccharides From Yeast Isolates. . *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(2), 537-542.
- Lamilla. (2020). Importancia de los bioestimulantes en el cultivo de papaya (Carica papaya). *UTB: Bachelor's thesis, BABAHOYO*.
- Loviso, & Libkind. (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista argentina de microbiología*, 50(4). pp 436-446.
- Melo. (2019). Bioactive Polysaccharides Produced by Microorganisms: Production and Applications. *High Value Fermentation Products*, (Scrivener Publishing, Wiley, eds.), 231-251.
- Mendoza. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23.
- Pons. (2019). Determinación de la tasa de consumo de oxígeno por parte de una levadura seca inactivada (LSI) seleccionada para proteger al vino de la oxidación. *Enología del siglo XXI*, pp3-8.
- Ragavan. (2019). Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. . *Annals of Microbiology*, 69(5) pp 515-530.
- Silva. (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 1(1), 47-73.
- Trujillo, & Hernández. (2015). Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M Perry (pomorroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva-Huila. *Ingeniería y Región*, 13, pp 37-45.
- Walker. (2000). Yeast Physiology and Biotechnology. *West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd*.
- Wickerham. (1951). Taxonomy of yeasts (No. 1029). *US Department of Agriculture*.

Yildiran. (2019). Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. *Food Science and Technology*, 39. pp 646-653.

11 ANEXO



Anexo 1. *Aislamiento de levaduras.* A) espécimen YAH 001 en 10X. B) espécimen YAH 002 en 10X. C) YAH001 en medio YPD. D) YAH002 en medio YPD.



Anexo 2. Formulación de las pruebas de oxidación.

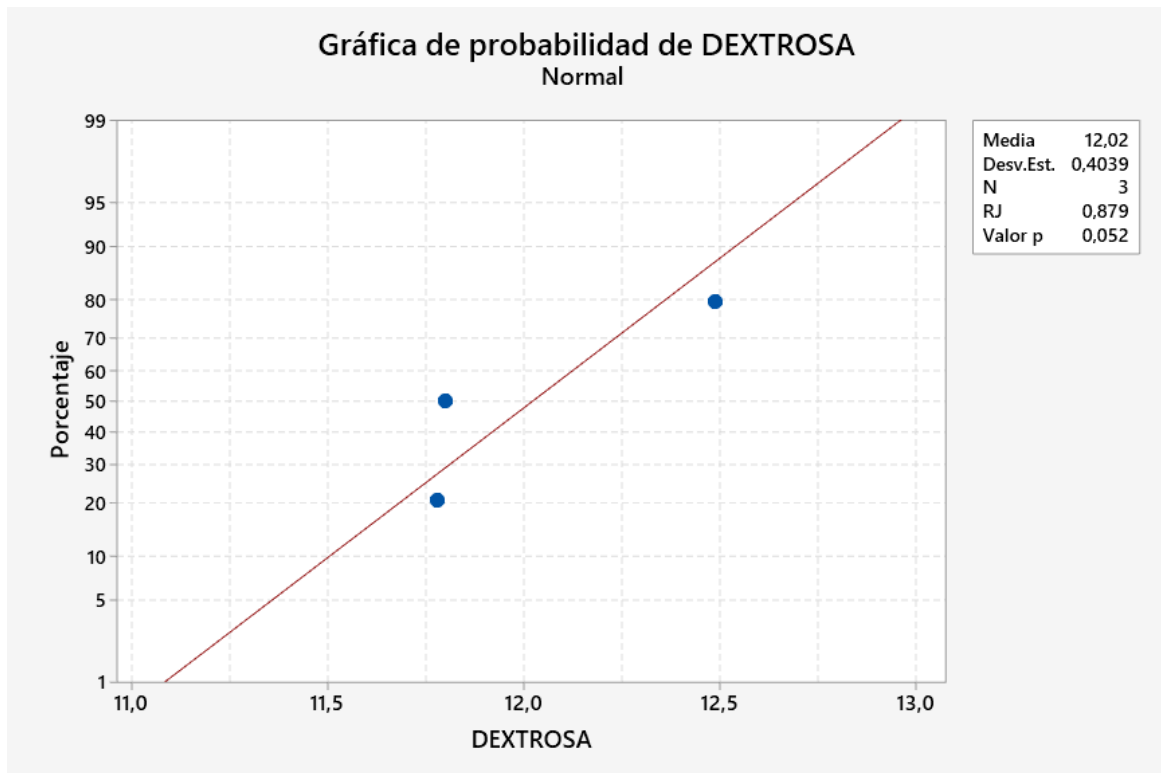


Figura 10. Prueba de normalidad en YAH 001 en Glucosa

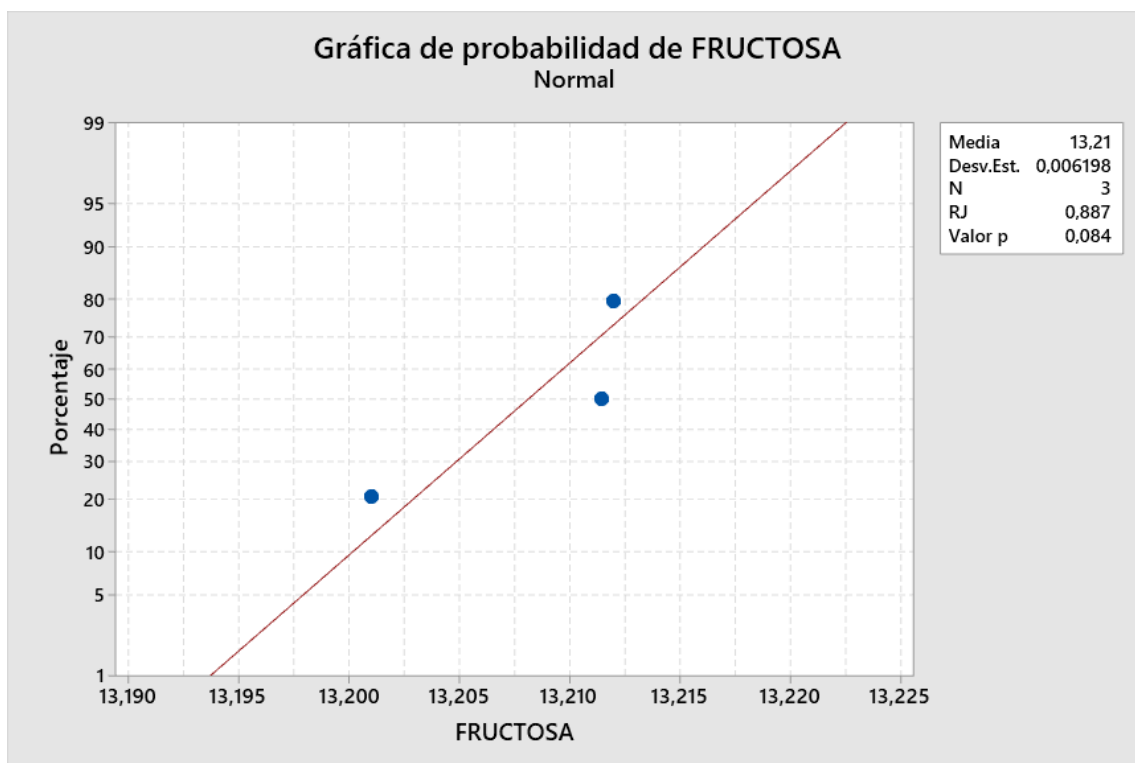


Figura 11. Prueba de normalidad en YAH 001 en Fructosa

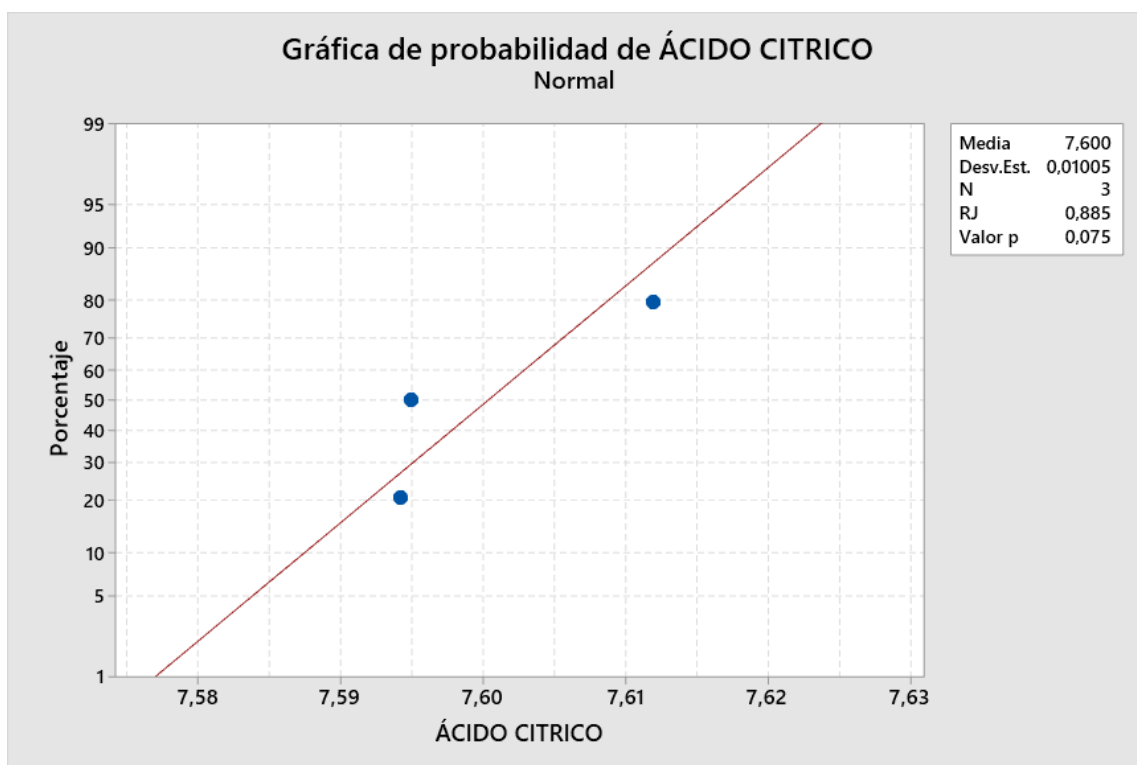


Figura 12. Prueba de normalidad en YAH 001 con Ácido cítrico

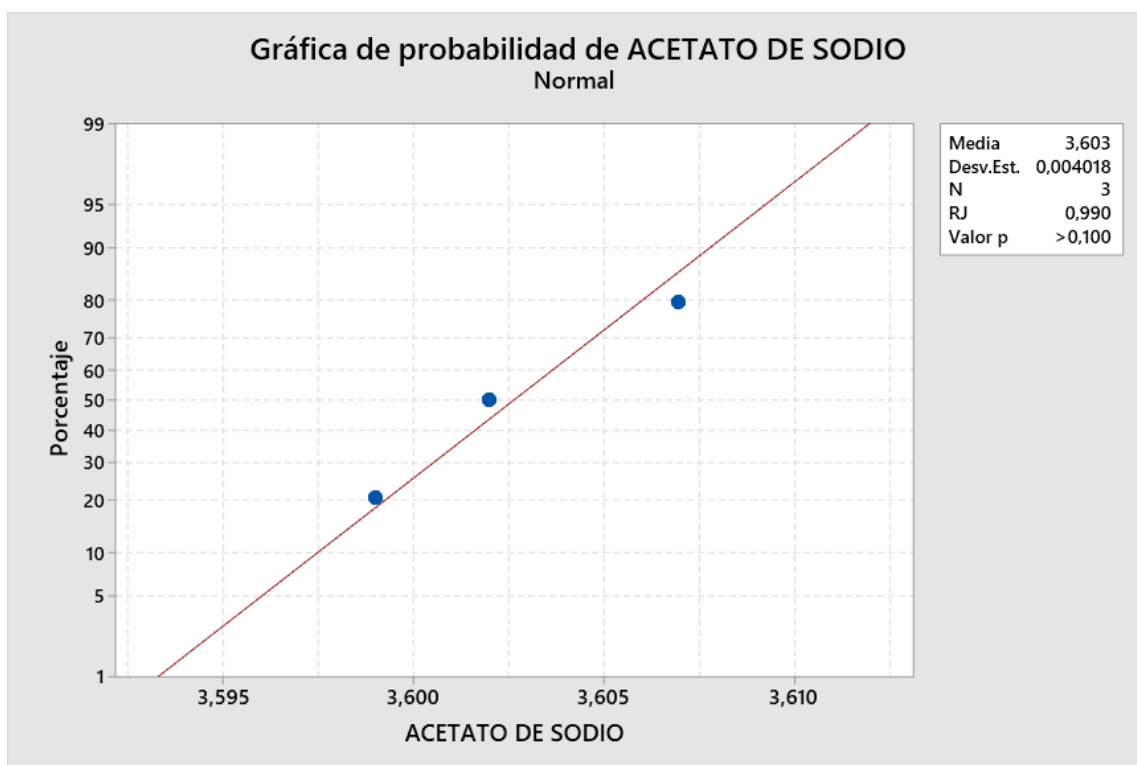


Figura 13. Prueba de normalidad en YAH 001 con Acetato de Sodio

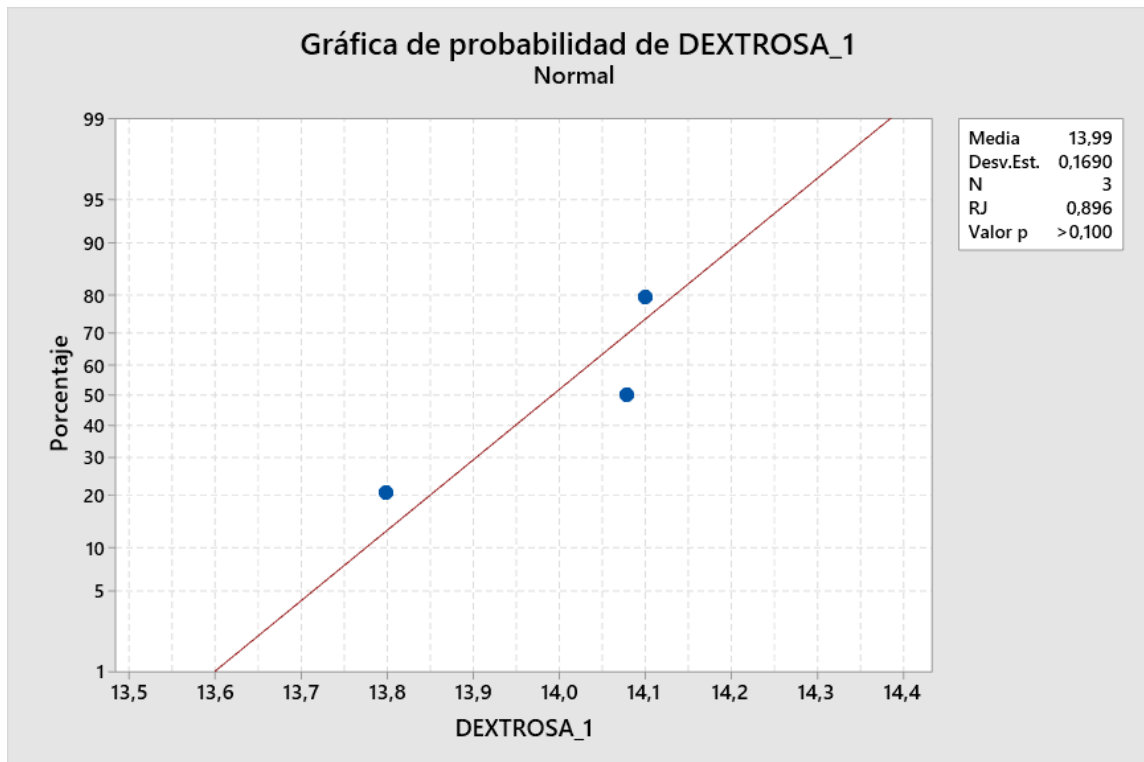


Figura 14. Prueba de normalidad en YAH 002 en Glucosa

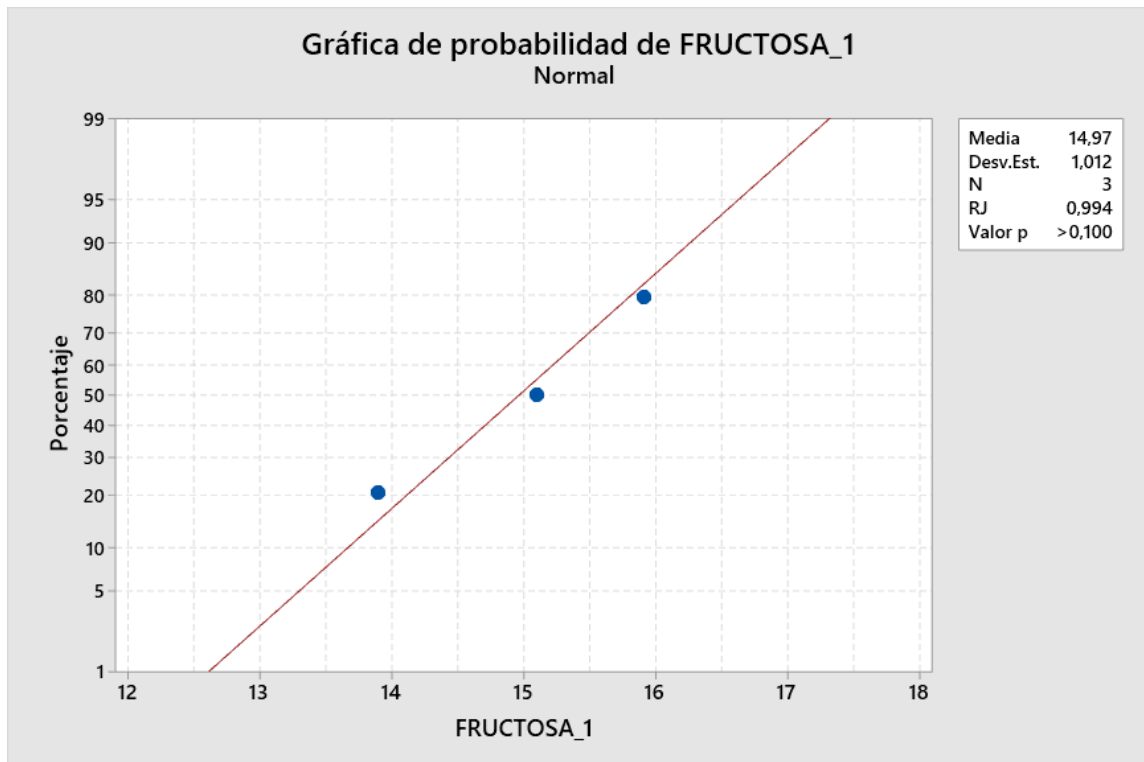


Figura 15.Prueba de normalidad en YAH 002 en Fructosa

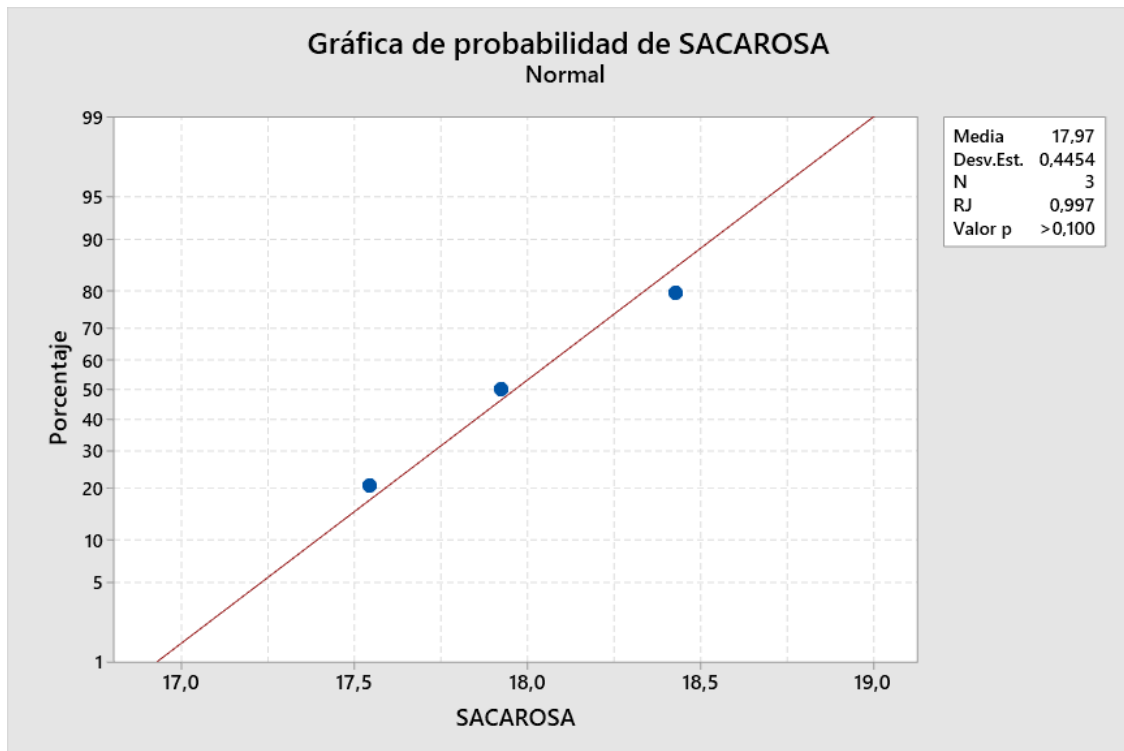


Figura 16. Prueba de normalidad en YAH 002 en Sacarosa

Tabla 6. Producción máxima de EPS en g/L de levaduras.

YHA 001				YHA 002		
DEXTROSA	FRUCTOSA	ÁCIDO CITRICO	ACETATO DE SODIO	DEXTROSA	FRUCTOSA	SACAROSA
Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
11,801	13,211	7,594	3,607	14,079	13,898	17,923
11,780	13,201	7,612	3,602	14,101	15,098	18,431
12,490	13,212	7,595	3,599	13,798	15,911	17,543