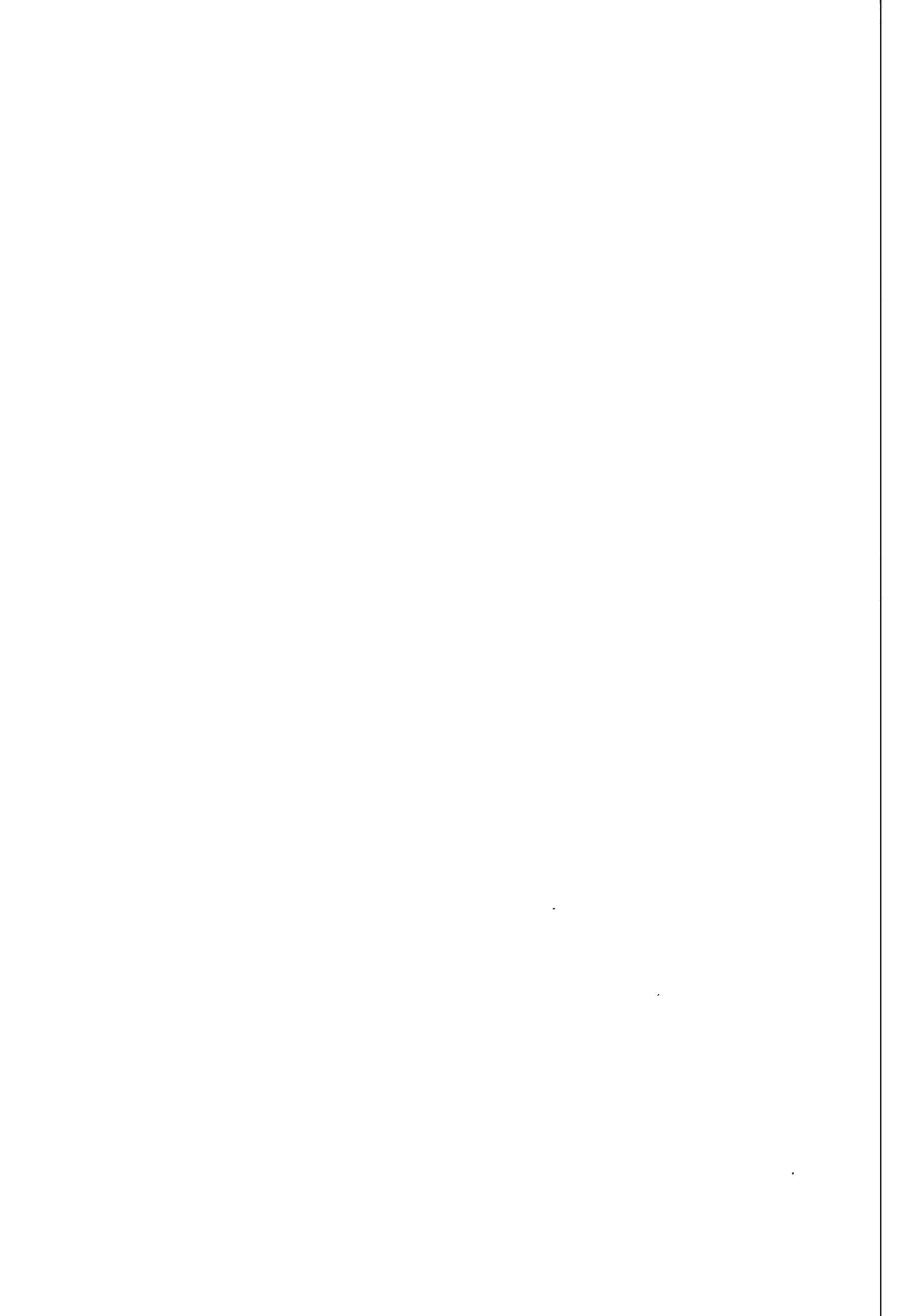




OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN  
DEL AGENTE DE BIOCONTROL  
Candida sake (CPA-1)













**Universitat de Lleida**

**OPTIMIZACIÓN DE LA  
PRODUCCIÓN DEL AGENTE  
DE BIOCONTROL  
*Candida sake* (CPA-1)**



Memoria presentada por:  
**SONIA M. AREVALO CHÁVEZ**  
para optar al grado de Doctora

Directores: Dra. Immaculada Viñas Almenar  
Dr. Josep Usall i Rodié

Noviembre de 1998



*A mis padres, mi  
familia del Ecuador y a  
mi “familia” de Lleida,  
mis amigos.*



# AGRADECIMIENTO

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda, dedicación y respaldo ofrecido por muchas personas e instituciones. La lista es muy larga y no quisiera perder la oportunidad de manifestarles mis más sinceros agradecimientos:

En primer lugar a mi tutora Immaculada Viñas, por haber sido la inspiradora y promotora de esta tesis. Sin sus consejos, optimismo y ayuda constante no se podría haber realizado.

A Josep Usall, guía y consejero, por sus enseñanzas en el campo de la investigación, diciendo las palabras justas en el momento oportuno.

A Neus Teixidó, compañera de fatigas, por su inestimable ayuda, sin cuya desinteresada colaboración y experiencia no se hubiera terminado este trabajo.

A Vicent Sanchis, por sus comentarios y enseñanzas muy sabias y acertadas.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional, por la beca concedida, sin cuya ayuda no podría haber realizado mi doctorado.

Al Centro UdL-IRTA por el gran soporte que he recibido para la realización de la presente tesis.

A los compañeros del laboratorio, Carla, Elena, Maribel, Luis, Àngels, Charo, Miquel Angel Estanis y Xavier, compañeros de trabajo por vuestra ayuda técnica, y palabras de ánimo cuando más lo necesitaba y por todos aquellos buenos momentos que compartimos juntos.

A mi madre Pachi, por sus cartas llenas de cariño y ánimos cada día a pesar de la distancia que fueron el soporte en los momentos más duros que pasé lejos de mis seres queridos, gracias por todo.

A mi padre Angel y hermanos, Freddy, Patricio, Soraya y Mónica, a Suanny y Mélani siempre espiritualmente a mi lado, por la moral y ánimos, por vuestro cariño.

A Irene, mi mejor amiga y hermana, por su cariño, preocupación, paciencia y consejos en mis altibajos y depresiones. Gracias Irene por todas aquellas largas noches de trabajo en que estuviste a mi lado sin cansancio ni fatiga.

A Txell, por su amistad sincera, por todas las horas que estuvo a mi lado, con su alegría y trabajo infatigable, sin ella no podría haber terminado la tesis.

A Emma, por su preocupación y constante ayuda, por su corrección ortográfica y en la redacción

de la tesis y en especial por su amistad.

A Joao, a mi segunda familia, mis amigos, Martha, Marc, Sandra, Emma, Juanjo, Manuel, Montse, Raúl, Salva, Lidia y tantos otros que han estado a mi lado durante los años de vida en Lleida, mi segunda ciudad a la cual recordaré con mucho cariño.

A toda la gente catalana, por su hospitalidad y acogida, por su espíritu trabajador, liberal, por sus ideales y tradiciones, que me enseñaron a valorar mis raíces y sentirme orgullosa de mi identidad latinoamericana.

A mi país, Ecuador por el que estoy aquí culminando una etapa muy importante de mi vida, por su gente y sus problemas, por su lucha constante para salir a flote de tanta pobreza y explotación.

A todos ellos ... ¡MUCHAS GRACIAS!.

**Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios de Microbiología del Departament de Tecnologia d'Aliments y en el de Patologia de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida, y ha recibido ayuda económica de la CIRIT y de la AECI.**



## ABREVIATURAS

AC	Atmósfera controlada.
CEE	Comunidad Económica Europea.
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50.
EEUU	Estados Unidos de América.
mM	Mili molar.
IRTA	Institut de Reserca i Tecnologia Agroalimentàries.
HU	Humedad relativa.
UE	Unión Europea.
ufc	Unidades formadoras de colonias.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>1. CONTROL BIOLÓGICO .....</b>	<b>2</b>
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Modelos de acción de los agentes de biocontrol.....	7
1.2.1. Competencia de nutrientes y/o espacio .....	8
1.2.2. Inhibición del patógeno por secreción de antibióticos y otros mecanismos inhibidores.....	10
1.2.3. Introducción de procesos de resistencia en el huésped .....	11
1.2.4. Interacción directa con el patógeno .....	12
1.2.5. Efecto del pH .....	12
1.3. Características deseables en un agente de biocontrol .....	12
1.4. Etapas de un programa para la obtención de antagonistas.....	14
1.4.1. Aislamiento de los microorganismos .....	14
1.4.2. Selección de los microorganismos.....	14
1.4.3. Pruebas posteriores.....	14
1.5. La flora microbiana y los posibles agentes de biocontrol.....	15
1.6. Bacterias y levaduras como posibles agentes de biocontrol .....	17
1.7. Incremento de la eficacia de los agentes de biocontrol en enfermedades de postcosecha .....	18
1.8. Situación actual del control biológico .....	19
1.9. Comercialización de agentes de biocontrol.....	22
1.10. Las levaduras como agentes de biocontrol.....	22
<b>2. Las levaduras .....</b>	<b>24</b>
2.1. Características generales .....	24
2.2. Criterios para su clasificación.....	27
2.3. Factores intrínsecos necesarios para el crecimiento de las levaduras.....	28
2.3.1. Actividad de agua .....	28
2.3.2. Acidez y capacidad tampón.....	31
2.3.2.1. Control de pH con soluciones tamponantes.....	31
2.3.3. pH .....	32
2.3.4. Potencial redox y capacidad de equilibrio .....	33
2.3.5. Nutrientes.....	33
2.3.5.1. Fuentes de carbono .....	34



2.1. Manzanas.....	70
3. Microorganismo antagonista .....	71
4. Patógeno .....	71
5. Sustancias nutritivas .....	72
6. Medios de crecimiento .....	72
6.1. Precio de los medios de crecimiento y suplementos nutritivos .....	73
6.2. Levadura de cerveza .....	74
6.3. Bagazo de cebada .....	75
6.4. Germen de cebada.....	76
6.5. Concentrado de zumo de manzana .....	77
6.6. Lactosuero .....	78
6.7. Derivado láctico.....	79
6.8. Melazas caña de azúcar y de remolacha azucarera .....	80
7. Antibiótico .....	82
8. Curva de correlación porcentaje de transmitancia-concentración (ufc/ml) de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) .....	82
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
1. Medios de cultivo .....	83
1.1. Normas generales de preparación .....	83
1.1.1. Medio de cultivo para repartir en placas.....	83
1.1.2. Medios de cultivo sólidos para repartir en tubos.....	83
1.1.3. Medios de cultivo líquidos para repartir en tubos.....	83
2. Medios de cultivo generales .....	84
2.1. Agar Nutritivo Levadura Dextrosa (NYDA) .....	84
2.2. Caldo Nutritivo Levadura Dextrosa (NYDB).....	84
2.3. Agar Patata Dextrosa (PDA).....	85
3. Medios de cultivo específicos .....	85
3.1. Medio mínimo salino para levaduras.....	85
4. Medios de cultivo simples para el crecimiento de la cepa <i>Candida sake</i> (CPA-1).....	87
4.1. Medio levadura de cerveza .....	87
4.2. Medio de bagazo de cebada .....	88
4.2.1. Infusión de bagazo de cebada.....	88
4.2.2. Cocción de bagazo de cebada .....	88
4.3. Medio de germen de cebada.....	89

4.3.1. Infusión de germen de cebada.....	89
4.3.2. Cocción de germen de cebada .....	90
4.4. Medio de concentrado de zumo de manzana.....	90
4.5. Medio de lactosuero.....	91
4.6. Medio de derivado láctico .....	93
4.7. Medio de melaza de caña de azúcar .....	93
4.8. Medio de melaza de remolacha azucarera .....	95
<b>5. Medios de cultivo combinados para el crecimiento de la cepa</b> <b><i>Candida sake</i> (CPA-1).....</b>	<b>96</b>
5.1. Medio combinado de bagazo de cebada con levadura de cerveza.....	97
5.2. Medio combinado de germen de cebada con levadura de cerveza.....	97
5.3. Medio combinado concentrado de zumo de manzana con levadura de cerveza.....	98
5.4. Medio combinado de concentrado de zumo de manzana con germen de cebada.....	99
5.5. Medio combinado lactosuero con levadura de cerveza.....	100
5.6. Medio combinado lactosuero con concentrado de zumo de manzana .....	101
5.7. Medio combinado lactosuero con germen de cebada .....	103
5.8. Medio combinado melaza de caña de azúcar con levadura de cerveza .....	103
5.9. Medio combinado melaza de caña de azúcar con bagazo de cebada .....	104
5.10. Medio combinado melaza de caña de azúcar con germen de cebada .....	105
5.11. Medio combinado melaza de caña de azúcar con concentrado de zumo de manzana.....	105
5.12. Medio combinado melaza caña de azúcar con lactosuero .....	106
5.13. Medio combinado melaza de caña de azúcar con derivado láctico.....	107
<b>6. Medios de cultivo enriquecidos con fuentes de nitrógeno</b> <b>vitaminas y sales minerales.....</b>	<b>108</b>
6.1. Medio concentrado zumo de manzana enriquecido con sulfato de amonio o con sulfato de amonio y fosfato dihidrógeno de potasio.....	108
6.2. Medio lactosuero enriquecido con sulfato de amonio y fosfato dihidrógeno de potasio .....	109
6.3. Medio lactosuero enriquecido con glucosa.....	110
6.4. Medio derivado láctico enriquecido con glucosa .....	111
6.5. Medio melaza de caña de azúcar enriquecido con urea a diferentes concentraciones .....	112
6.5.1. Medio melaza de caña de azúcar 30 g/l y urea a diferentes	

concentraciones .....	112
6.5.2. Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea a diferentes concentraciones .....	113
6.5.3. Medio melaza de caña de azúcar 50 g/l y urea a diferentes concentraciones .....	115
6.6. Medio melaza de caña de azúcar enriquecido con sulfato de amonio a diferentes concentraciones .....	116
6.6.1. Medio melaza caña de azúcar y sulfato de amonio 20 mM (2,65 g/l)	116
6.6.2. Medio melaza de caña de azúcar y sulfato de amonio 4 g/l .....	117
6.7. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con vitaminas .....	118
6.8. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con biotina.....	119
6.9. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con sales de manganeso y cobre.....	120
6.10. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con biotina, sales de manganeso y cobre .....	121
6.11. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con fosfato dihidrógeno de potasio.....	122
6.12. Medio melaza de remolacha azucarera enriquecido con urea como fuente de nitrógeno.....	123
6.12.1. Medio melaza de remolacha azucarera 30 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	123
6.12.2. Medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	124
6.12.3. Medio melaza de remolacha azucarera 50 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	125
6.12.4. Medio melaza de remolacha azucarera 60 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	126
6.12.5. Medio de melaza de remolacha azucarera 70 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	127
6.12.6. Medio melaza de remolacha azucarera 90 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	128
6.12.7. Medio melaza de remolacha azucarera 110 g/l y urea en diferentes concentraciones .....	129
6.13. Medio melaza de remolacha azucarera enriquecido con sulfato de amonio en diferentes concentraciones .....	130
6.14. Medios combinados enriquecidos de melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera con urea.....	131
7. Medios de cultivo con pH modificados.....	132

<b>7.1. NYDB con pH modificado.....</b>	<b>132</b>
<b>7.2. Medio mínimo salino pH modificado con ácidos, bases y sales .....</b>	<b>133</b>
7.2.1. Medio mínimo salino modificando su pH con ácido clorhídrico y con hidróxido de sodio.....	133
7.2.2. Medio mínimo salino modificado su pH con ácido cítrico y con fosfato hidrógeno de sodio.....	134
<b>7.3. NYDB pH modificado con ácidos cítrico y fosfato de hidrógeno de sodio.....</b>	<b>136</b>
7.3.1. NYDB pH modificado a 9 con solución glicina/cloruro de sodio/hidróxido de sodio .....	137
<b>7.4. Melaza de caña de azúcar y urea pH modificado con soluciones tamponantes. ....</b>	<b>138</b>
7.4.1. Medio melaza de caña de azúcar con urea pH modificado con ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio.....	138
7.4.2. Medio melaza de caña de azúcar y urea pH modificado a 9 con solución glicina/cloruro de sodio/hidróxido de sodio .....	139
7.4.3. Medio melaza de caña de azúcar y urea pH modificado a 7 con ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio.....	140
7.4.4. Medio melaza de caña de azúcar y urea pH modificado a 7 con tartrato hidrógeno de potasio .....	141
7.4.5. Medio melaza de caña de azúcar y urea pH modificado a 7 con fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio.....	142
<b>7.5. Medio melaza de remolacha azucarera modificado su pH con diferentes ácidos bases y soluciones tamponantes .....</b>	<b>142</b>
7.5.1. Medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l pH modificado con ácido clorhídrico.....	142
7.5.2. Medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l pH modificado con solución tampón ácido cítrico y fosfato hidrógeno de sodio	144
7.5.3. Medio melaza de remolacha azucarera y urea pH modificado a 7 con ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio.....	145
7.5.4. Medio melaza de remolacha azucarera y urea pH modificado a 7 con tartrato hidrógeno de potasio .....	145
7.5.5. Medio melaza de remolacha azucarera y urea pH modificado a 7 con fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio.....	146
<b>7.6. Medios mínimos salinos modificados sus pH con diferentes complejos tamponantes... ..</b>	<b>147</b>
7.6.1. Medio mínimo salino modificado a pH 4 con ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio.....	147
7.6.2. Medio mínimo salino modificado a pH 4 con tartrato hidrógeno	

de potasio.....	148
7.6.3. Medio mínimo salino modificado a pH 4 con acetato de sodio/ácido acético.....	149
7.6.4. Medio mínimo salino modificado a pH 7 con fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio.....	149
7.6.5. Medio mínimo salino pH modificado a 7 con fosfato hidrógeno de sodio.....	150
7.6.6. Medio mínimo salino pH modificado a 8 con acetato de sodio/hidróxido de sodio.....	151
7.7. Medio mínimo salino en que se reemplaza la glucosa por diferentes fuentes de carbono.....	151
7.7.1. Medio mínimo salino sin fuentes de carbono.....	151
7.7.2. Medio mínimo salino con ácido cítrico modificado a pH 3.....	152
7.7.3. Medio mínimo salino con tartrato hidrógeno de potasio a pH 4.....	152
7.7.4. Medio mínimo salino con ftalato hidrógeno de potasio a pH 4.....	153
<b>8. Medios de cultivo de melaza de caña de azúcar con urea a diferentes actividades de agua (<math>a_w</math>).....</b>	<b>153</b>
8.1. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,999.....	153
8.2. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,972.....	154
8.3. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,968.....	154
8.4. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,966.....	155
8.5. Medio NYDB con glicerol. $a_w$ 0,964.....	155
8.6. Medio NYDB con glucosa. $a_w$ 0,96.....	156
8.7. Medio líquidos externos para mantener los medios de melazas urea a diferentes $a_w$ durante el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....	156
8.7.1. Medio glicerol. $a_w$ 0,998.....	156
8.7.2. Medio glicerol. $a_w$ 0,971.....	157
8.7.3. Medio glicerol. $a_w$ 0,967.....	157
<b>9. Medio de melaza urea para crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en fermentador.....</b>	<b>158</b>
9.1. Medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l para fermentador...	158
9.2. Medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l para fermentador.....	158
<b>10. Disoluciones amortiguadoras, reactivos y colorantes.....</b>	<b>159</b>
10.1. Solución tampón fosfato.....	159
10.2. Solución de tween 80.....	159
10.3. Solución colorante de azul de metileno.....	160

<b>11. Conservación de los cultivos .....</b>	<b>160</b>
11.1. Conservación en criobolas a -20°C de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) .....	160
11.2. Mantenimiento .....	161
11.2.1. Mantenimiento en medio NYDA a 4°C del microorganismo antagonista.....	161
11.2.2. Mantenimiento del microorganismo patógeno.....	161
<b>12. Cálculo de las concentraciones .....</b>	<b>162</b>
12.1. Cálculo de la concentración de levaduras.....	162
12.1.1. Recuento en cámara Thoma .....	162
12.1.2. Transmitancia.....	163
12.2 Cálculo de concentración de <i>Penicillium expansum</i> por recuento en cámara Thoma.....	164
<b>13. Determinación de levaduras viables por tinción con azul de metileno.....</b>	<b>164</b>
<b>14. Optimización del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....</b>	<b>165</b>
14.1. Determinación del medio de cultivo más óptimo de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1), criterios para la selección de cada uno de los medios.....	165
14.2. Preparación de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) para inocular en los diferentes medios de crecimiento.....	167
14.3. Combinación de medios de crecimiento.....	168
14.4. Enriquecimiento de los diferentes medios de crecimiento.....	168
14.4.1. Medio concentrado de zumo de manzana con fuente de nitrógeno y sales minerales.....	168
14.4.2. Medio lactosuero con fuentes de nitrógeno y sales minerales.....	169
14.4.3. Medio de lactosuero con fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales .....	169
14.4.4. Medio de derivado láctico con fuentes de carbono .....	169
<b>15. Mejora de los medios melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera por adición de nutrientes.....</b>	<b>169</b>
<b>16. Determinación de los parámetros óptimos para el crecimiento de de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio melaza de caña de azúcar y urea.....</b>	<b>171</b>
16.1. Determinación del rango de pH en el cual crece la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....	171
16.1.1. Determinación del rango de pH en el cual crece <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio NYDB.....	171
16.1.2. Determinación del rango de pH en el cual crece <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio mínimo salino para levaduras modificado su pH con diferentes	

soluciones de sales y soluciones tamponantes.....	171
16.1.3. Determinación del rango de pH en el cual crece <i>C. sake</i> (CPA-1) en el mejor medio de crecimiento .....	172
16.2. Determinación del rango de temperatura en el cual crece la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) .....	173
16.3. Crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ).....	173
17. Efecto de los diferentes nutrientes sobre el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio mínimo salino.....	174
18. Pruebas de crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en diferentes muestras de melaza de caña de azúcar.....	175
18.1. Análisis físicoquímico y pruebas de crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en diferentes muestras de melaza de caña de azúcar.....	175
18.2. Pruebas de crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en melaza caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera con urea o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno con diferentes grados de pureza.....	176
19. Influencia de la variación de la concentración del inóculo en la producción de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) .....	177
20. Determinación de la influencia del medio de cultivo en el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) utilizada como cultivo estárter para inocularlo en el fermentador .....	178
21. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....	179
21.1. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) a diferentes tiempos.....	179
21.2. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) a diferentes temperaturas .....	180
21.3. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) en medio melaza de caña de azúcar urea .....	180
21.4. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio melaza de caña de azúcar y urea en fermentador.....	182
21.5. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio melaza de remolacha azucarera en fermentador .....	183
21.6. Dinámica poblacional de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) sobre la superficie de manzana “Golden delicious” en diferentes condiciones de atmósfera controlada .....	184

<b>22. Determinación de la capacidad antagónica la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en el control de <i>P. expansum</i> en manzanas “Golden Delicious”.....</b>	<b>186</b>
22.1. Ensayo a nivel secundario para la evaluación de la efectividad antagónica..	186
22.1.1. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea y melaza de remolacha azucarera con urea diferentes concentraciones y $a_w$ .....	186
22.1.2. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea y comparada con la efectividad del antagonista crecidoa diferentes $a_w$ , modificadas con glicerol y glucosa.....	188
22.1.3. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea, melaza de remolacha azucarera con urea y combinación de las dos melazas .....	189
22.1.4. Ensayo de efectividad del antagonista crecido a diferentes horas en medio melaza de caña de azúcar con urea.....	190
22.1.5. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea sobre manzana mantenida en condiciones de frigoconservación.....	190
<b>23. Determinación del estado de madurez de la fruta.....</b>	<b>191</b>
23.1. Peso y calibre.....	191
23.2. Dureza.....	192
23.3. Sólidos solubles .....	192
23.4. Acidez.. .....	193
<b>24. Tratamiento estadístico.....</b>	<b>193</b>

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 196**

<b>1. Pruebas de crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en diferentes medios de cultivo.....</b>	<b>196</b>
1.1. Prueba preliminar en medio NYDB a diferentes pH.....	199
1.2. Crecimiento en levadura de cerveza.....	200
1.3. Crecimiento en bagazo de cebada.....	201
1.4. Crecimiento en germen de cebada.....	202
1.5. Crecimiento en concentrado de zumo de manzana .....	203
1.5.1. En medio simple de concentrado de zumo de manzana .....	203
1.5.2. En concentrado de zumo de manzana enriquecido con sulfato de amonio y fosfato hidrógeno de potasio .....	204
1.6. Crecimiento en derivados lácteos.....	205

1.6.1. En lactosuero .....	205
1.6.2. Lactosuero enriquecido con sulfato de amonio y fosfato hidrógeno de potasio .....	206
1.6.3. En lactosuero enriquecido con glucosa como fuente de carbono .....	207
1.6.4. En derivado láctico .....	208
1.6.5. En derivado láctico enriquecido con glucosa como fuente de carbono .....	209
1.7. Crecimiento en melaza de caña de azúcar.....	210
1.8. Crecimiento en melaza de remolacha azucarera.....	212
<b>2. Crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medios combinados....</b>	<b>213</b>
2.1. Medio combinado de bagazo de cebada con otros medios.....	213
2.2. Medio germen de cebada combinado con otros medios simples.....	214
2.3. Medio concentrado de zumo de manzana combinado con otros medios simples.....	215
2.4. Medio lactosuero combinado con otros medios simples.....	217
2.5. Medio melaza de caña de azúcar combinado con otros medios simples .....	219
<b>3. Mejora del medio de cultivo con mayor crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....</b>	<b>221</b>
3.1. Incorporación de nutrientes en el medio de melaza de caña de azúcar para determinar su influencia en el crecimiento del antagonista.....	223
3.1.1. Enriquecimiento del medio melaza de caña de azúcar con urea .....	223
3.1.2. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar con sulfato de amonio.....	226
3.1.3. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar y urea con vitaminas y sales minerales .....	227
3.1.4. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar con urea y fosfato hidrógeno de potasio.....	229
3.2. Incorporación de nutrientes en el medio de melaza de remolacha azucarera para determinar su influencia en el crecimiento del antagonista .....	230
3.3. Crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio combinado de melaza de caña de azúcar con melaza de remolacha azucarera para determinar su influencia en la mejora del crecimiento .....	234
<b>4. Determinación de las mejores condiciones de crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....</b>	<b>235</b>
4.1. Determinación del mejor rango de pH .....	235
4.1.1. Modificación del pH en medio mínimo salino.....	235
4.1.2. Modificación del pH en medio NYDB.....	237

4.1.3. Modificación del pH en medio melaza de caña de azúcar.....	237
4.1.4. Modificación del pH en medio melaza de remolacha azucarera.....	239
4.1.5. Modificación del pH del medio mínimo salino con diferentes disoluciones tamponantes a diferentes pH.....	240
4.1.6. Crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en el medio mínimo salino con diferentes fuentes de carbono que reemplazan a la glucosa, y actúan como reguladores del pH.....	242
4.1.7. Influencia de disoluciones tamponantes en el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio de melazas a diferentes pH.....	242
4.2. Determinación de la influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar con urea.....	244
<b>5. Dinámica poblacional de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....</b>	<b>245</b>
5.1. En medio de melaza de caña de azúcar con urea a 20°C, 25°C y 30°C.....	245
5.2. En medio de melaza de caña de azúcar con urea a 22°C, 24°C y 26°C.....	247
5.3. En medio de melaza de caña de azúcar con urea a diferentes actividades de agua.....	248
5.4. En el medio de melaza de caña de azúcar con urea en fermentador.....	250
5.5. En medio de melaza de remolacha azucarera con urea en fermentador.....	251
5.6. En la superficie de la fruta bajo diferentes condiciones de frigoconservación	253
<b>6. Optimización de costes del mejor medio de cultivo para la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....</b>	<b>255</b>
6.1. Análisis físico-químico de diferentes muestras de melaza de caña de azúcar...	255
6.2. Crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio de melaza de caña de azúcar con urea y con diferentes concentraciones de inóculo.....	257
6.3. Determinación de la influencia del medio de crecimiento del cultivo estéril de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en el crecimiento del microorganismo antagonista.....	258
6.4. Influencia de la pureza de la fuente de nitrógeno en el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en medio melaza de caña de azúcar con urea y melaza de remolacha azucarera con urea.....	259
6.5. Estudio de precios de los diferentes medios utilizados para el crecimiento de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1).....	261
6.5.1. Medio de germen de cebada 20%.....	261
6.5.2. Medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.....	261
6.5.3. Melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l.....	262
<b>7. Efectividad de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) como agente de biocontrol de podredumbres en manzanas “Golden Delicious”.....</b>	<b>263</b>

---

7.1. Efectividad de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) crecida en varios medios de cultivo...	263
7.2. Efectividad de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) crecida en medios con diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) .....	264
7.3. Efecto del tiempo de crecimiento en la efectividad de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) crecida en medio de melaza de caña de azúcar con urea.....	267
7.4. Efectividad de la cepa <i>C. sake</i> (CPA-1) en un ensayo a temperatura de conservación frigorífica .....	268
7.5. Determinación de la calidad y madurez de la fruta utilizada para las pruebas de efectividad .....	271
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>274</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>278</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>296</b>



# ***Introducción***

---

# INTRODUCCIÓN.

## 1. CONTROL BIOLÓGICO.

### 1.1. Antecedentes.

Las patologías de postcosecha en fruta y vegetales frescos han sido controladas durante muchos años por fungicidas químicos de síntesis (Eckert y Ogawa, 1985).

Durante la cosecha y almacenamiento de frutas y vegetales, la aplicación de productos químicos se considera esencial para evitar pérdidas debido a enfermedades o alteraciones producidas en el transporte y manipulación, por lo que generalmente su administración es en elevadas dosis (Wilson y Wisniewski, 1989). Los pesticidas son particularmente utilizados en la producción de manzanas y frutas y son aplicados en el campo, la cosecha y antes de ser almacenadas.

Si bien los fungicidas fueron los primeros en ser utilizados para el control de enfermedades de postcosecha, su utilización masiva determinó la aparición de cepas de hongos patógenos resistentes a productos fitosanitarios (Droby *et al.*, 1991), disminuyendo así la efectividad de los mismos. El *Mucor piriformo* es uno de los patógenos de postcosecha de manzanas y peras que no es controlado por ningún fungicida registrado (Spotts y Dobson, 1989).

En los últimos años, después de investigaciones y sobre los riesgos de la aplicación de productos químicos en alimentos, la National Academy of Science (NAS) ha manifestado que “Algunas clases de fungicidas presentan especiales dificultades por tener en su composición compuestos potencialmente oncogénicos. Sin embargo, para ciertos cultivos y en ciertas regiones el no usar los fungicidas y compuestos oncogénicos puede causar severos problemas en el control de plagas, siendo además la alternativa más económica”.

Actualmente está aumentando el número de consumidores que demandan la reducción del uso de fungicidas químicos, simultáneamente ha aumentado el número de pesticidas que se retiran del mercado después de evaluar su toxicidad y su nocividad tanto para la salud humana como para la degradación del medio ambiente.

U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) continuamente promulga regulaciones y restricciones en el uso de pesticidas en Estados Unidos, por lo que se buscan nuevos métodos alternativos de control (actualmente en los Estados Unidos existen sólo diez fungicidas registrados para su aplicación en postcosecha, y en el futuro deben disminuir). Igualmente en algunos países europeos algunos pesticidas químicos usados en tratamientos de postcosecha han sido o serán muy pronto prohibidos (Rendall-Dunn, 1991).

Se están haciendo numerosos esfuerzos por restringir o eliminar el uso de pesticidas (Gullino y Kuijpers, 1994; Ragsdale y Sisler, 1994). A la lista de fungicidas prohibidos se están adicionando aquellos que influyen en el desarrollo de enfermedades iatrogénicas (Janisiewicz, 1991).

Debido a que los tratamientos químicos aplicados son potencialmente perjudiciales, progresivamente se está limitando o prohibiendo su uso. Por esta razón urge la necesidad de un nuevo y efectivo método de control de enfermedades de postcosecha que suponga menos riesgo para la salud humana y el medioambiente (Wilson y Wisniewski, 1989; Wilson *et al.*, 1991).

Entre las nuevas estrategias que se están desarrollando se considera que el control biológico es uno de los medios más efectivo en el control de enfermedades de postcosecha en frutas y vegetales (Utkhede y Sholberg, 1986).

Actualmente existe gran cantidad de programas internacionales orientados al control biológico de varias enfermedades de postcosecha tanto en frutas y vegetales, como en flores a temperaturas de climas tropicales y subtropicales (Janisiewicz, 1991; Fokkema *et al.*, 1993; Korsten *et al.*, 1994; Wilson y Wisniewski, 1994; Viñas *et al.*, 1998).

Entre otras alternativas de creciente interés, están los tratamientos físicos alternativos: Irradiaciones gamma, pretratamientos térmicos y gaseosos, regímenes térmicos cíclicos y regímenes gaseosos modulados (Artés, 1994), cambios graduales de la temperatura. Así pues, tratamientos de manzanas durante 10 minutos a temperaturas de 45 °C reducen la podredumbre de *Gloesporium*.

Las bajas temperaturas mantienen la calidad de la fruta por la supresión de la senescencia que se amplía con la reducción de la concentración de oxígeno (Sharples, 1982). Concentraciones del 1 % de oxígeno pueden reducir significativamente la esporulación y germinación de muchos hongos causantes de podredumbre de postcosecha.

El control de enfermedades de postcosecha en frutas y vegetales por mecanismos que se pueden considerar como biológicos incluyen el uso de extractos de plantas fungicidas (Sholberg y Shimizu, 1991; El-Ghaouth *et al.*, 1992; Aharoni *et al.*, 1993), resistencias inducidas (Stevens *et al.*, 1990; Chalutz *et al.*, 1992; Droby *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1994) y el uso de microorganismos (Wilson y Wisniewski, 1994).

Recientemente la utilización del control biológico como nueva alternativa para el control de patologías desarrolladas durante la postcosecha y el almacenamiento de frutas y vegetales está tomando auge. Anteriormente pasaba inadvertido por la mayor efectividad de los químicos como métodos de control (Janisiewicz, 1988b). Además ha aumentado el interés en los países más desarrollados por alimentos sanos, biológicos, sin tratamientos químicos.

El 4 de octubre de 1989, se presentó un proyecto legislativo dirigido a la creación de una Denominación de Calidad de los Productos Frutícolas “Agricultura Ecológica” y de su correspondiente Consejo Regulador, al cual se pueden acoger los productos que no hayan sido tratados químicamente para ser conservados.

En el área de la postcosecha el control biológico se presenta como un buen sistema para el control de las enfermedades de postcosecha, pero algunos factores limitantes dificultan su utilización:

1. El requerimiento de un 95 - 98 % en el control de enfermedades es extremadamente alto.
2. Las consideraciones de seguridad alimentaria son muy estrictas al juzgar la adición de microorganismos directamente al alimento (Chalutz y Droby, 1997).
3. El mercado potencial para el uso de biofungicidas desarrollados para el control de enfermedades de precosecha, es mayor comparado con el de control de enfermedades de postcosecha (Justum, 1988).

Algunos trabajos recientes muestran resultados prometedores en el uso de microorganismos en el control de enfermedades de postcosecha de frutas: *Pseudomonas syringae* para podredumbres de *Penicillium expansum* (Janisiewicz, 1987), *Pichia guilliermondii* para podredumbres de *Botrytis cinerea* (Wisniewski *et al.*, 1988), *Candida sake* CPA-1 para podredumbres de *B. cinerea*, *Rhizopus nigricans* y *P. expansum* en manzanas (Janisiewicz, 1987, 1988a; Janisiewicz y Roitman, 1988; Viñas *et al.*, 1997).

La idea de la lucha microbiológica no es algo nuevo. El uso natural de microorganismos para combatir enfermedades de postcosecha en frutas fue sugerido en los años 1950 (Gutter y Littauer, 1953). Leben, en 1965, también habla de la relación existente entre los microorganismos epífitos de las plantas y sus enfermedades e indica que la superficie de las partes aéreas de las plantas son un buen hábitat para el crecimiento de una microflora característica según la especie, algunas de las cuales son capaces de interferir en el crecimiento de los patógenos.

El análisis y estudio de la microflora natural presente en las frutas lleva al descubrimiento de una gran variedad de microorganismos en los que se incluyen a microorganismos antagonistas para el control de los patógenos de postcosecha (Janisiewicz, 1987).

Resulta complejo definir el concepto de control biológico, pero en el sentido más amplio se podría referir a todos aquellos sistemas de control diferentes a los que usan productos químicos de síntesis. Sin embargo las estrategias de control por medio de métodos de crecimiento y de variedades resistentes se discuten separadamente (Parry, 1990).

Baker y Cook, en 1974, definen el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo

o de la producción de enfermedades por parte del patógeno o de su actividad como parásito mediante uno o más organismos, por acción natural o a través de la manipulación del ambiente, el huésped o el antagonista.

Cook en 1982 agrupa los diferentes aspectos del control biológico de los patógenos de las plantas en tres amplios apartados:

1. La reducción de las poblaciones del patógeno mediante la utilización de microorganismos antagonicos que destruyen el inoculo del patógeno reduciendo el vigor y la agresividad del mismo.
2. La protección de la superficie de las plantas a través del establecimiento del microorganismo en las heridas o en la superficie del material vegetal, que actúan de barrera debido a una acción de competencia, producción de antibiótico o parasitismo del patógeno.
3. El establecimiento de microorganismos no patógenos o de agentes de biocontrol entre la planta o el área infectada y el patógeno, estimulando la resistencia de la planta o bien ocupando el área infectada, evitando así que el patógeno pueda utilizar los nutrientes o desplazarlo de la lesión.

En 1988 Nigam y Mukerji indican que el control biológico es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre, de los agentes vivos que de forma natural tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca un aumento de su ataque sobre las enfermedades, asimismo explica que la relación biológica entre los agentes de control y los patógenos es bastante específica, de tal forma que se ha de buscar un método de control para cada enfermedad.

Otro punto a considerar es que en el ambiente de la postcosecha los cambios que se puedan producir para mejorar el desarrollo de las condiciones favorables al control biológico pueden ser elevadas. El control parcial del medio, particularmente temperatura y humedad, puede ayudar a variar el balance de las interacciones entre el huésped, el patógeno y el antagonista en favor del antagonista, por lo que resultados de investigaciones a nivel de laboratorio y tests semicomerciales pueden ser aplicados y dar resultados muy semejantes en el área comercial de postcosecha, bajo condiciones controladas (Chalutz y Droby, 1997).

La restrictiva área de aplicación directa de los productos de biocontrol sobre los productos cosechados, permite mejorar su eficacia, no sólo porque está directamente sobre la zona que lo necesita, sino también porque durante la postcosecha se toman medidas profilácticas de limpieza para potenciar su conservación.

El concepto de control biológico en enfermedades ha sufrido desde un principio modificaciones en lo referente a su contenido y definición. Actualmente, se acepta la definición del control biológico de las enfermedades de las plantas como la reducción de inóculo o de la actividad productora de la enfermedad por el patógeno, debido a uno o más organismos, incluida la planta huésped y excluido el hombre. De esta definición se desprende un gran número de potenciales vías a explorar en la búsqueda del control de las enfermedades de postcosecha en frutas y verduras (Wilson y Wisniewski, 1989), que podrían ser:

- ◆ Uso de microorganismos antagonistas.
- ◆ Uso de fungicidas derivados de metabolitos secundarios de la planta.
- ◆ Manipulación de la resistencia de productos recolectados.

De estas vías, la que se refiere al uso de microorganismos antagonistas es la que, en principio, ha obtenido más éxitos y a la que actualmente se destinan más recursos.

Uno de los agentes microbianos más estudiados y utilizados en la lucha microbiológica son algunas especies del género *Trichoderma*, que es un microorganismo de crecimiento muy rápido y con necesidades nutricionales muy sencillas (Tronsmo, 1986). Muchos de los aislados de *Trichoderma*, presentan uno o más mecanismos de actuación contra los patógenos: la producción de algún antibiótico (Webster y Lomas, 1964), buenos competidores para los nutrientes (Hulme y Shields, 1970) y una interacción con las hifas (Dennis y Webster, 1971). *Trichoderma harzianum* se utiliza como antagonista en el control de los ataques de *Botrytis cinerea* en manzanos (Tronsmo, 1983).

También se ha conseguido reducir la podredumbre de *Penicillium digitatum* en limones del 35 % al 8 % mediante la aplicación de *Trichoderma viridiae* (De Matos, 1983). Sin embargo, contamos también con las experiencias de Tronsmo y Raa (1977) en las que si bien, se logró controlar la podredumbre de *B. cinerea* en manzanas almacenadas a 22 °C, mediante la inoculación de *Trichoderma pseudokoningii*, no se obtuvo control en manzanas almacenadas a 4 °C debido a que esta cepa no crece a temperaturas inferiores a 9 °C.

El tratamiento con los microorganismos antagonistas se puede realizar antes de que la fruta entre en las cámaras frigoríficas, utilizando las mismas tecnologías y equipos que se utilizan con los productos fitosanitarios. Algunos autores sugieren que podría ser una ventaja la aplicación del antagonista ya en el campo (Leibinger *et al.*, 1997) debido a que algunas infecciones en frutas por parte de hongos patógenos son transmitidos ya en el campo (Roberts, 1994; Biggs, 1995).

Las condiciones ambientales de las cámaras de frigoconservación: bajas temperaturas, elevada humedad relativa y variada concentración de gases, determinan la supervivencia y efectividad del antagonista. Este hecho unido a su capacidad de colonizar la herida son los factores que determinan mayoritariamente su utilización. Un ejemplo lo tenemos en el uso de benomilo en el control de *Penicillium* sp. y de *Colletotrichum gloeosporoides* en cítricos, que provoca un aumento de la incidencia de *Alternaria tenuis* (Singh, 1980).

## 1.2. Modos de acción de los agentes de biocontrol.

El biocontrol en enfermedades de frutas es un complejo fenómeno donde la fruta y el medio ambiente interaccionan con el antagonista y el patógeno. Una de las mayores dificultades consiste en entender y estudiar las interacciones que tienen lugar entre el huésped, el patógeno, el antagonista y posiblemente otros microorganismos presentes en la zona de interacción. Un conocimiento exhaustivo de las bases de estas interacciones no son un requisito para tener éxito en la aplicación del biocontrol, sin embargo, este conocimiento puede facilitar el desarrollo de sistemas de biocontrol que den mejores resultados. Por otra parte, la interpretación de los resultados obtenidos en estudios *in vitro* y mecanismos del modo de acción, pueden ser cruciales para el aislamiento y testaje de nuevos y efectivos antagonistas (Chalutz y Droby, 1997).

Considerando la relativa uniformidad de los sistemas de almacenamiento de la fruta, se puede realizar un sistema de estudio con mayor facilidad. En el caso de las infecciones de las frutas, que se dan generalmente por heridas, las posibles acciones del agente de biocontrol pueden ser:

1. Colonización de la herida por un antagonista competente que excluye al patógeno por competición de nutrientes y espacio.
2. Inhibición de las germinaciones de las esporas de los patógenos y crecimiento de éstos.
3. Estimulación del propio incremento de los mecanismos de resistencia.

En general el mecanismo de biocontrol de varios antagonistas no está claro, pero entre todas las posibilidades la competición de nutrientes o el incremento de la resistencia de la fruta, son las más probables (Janisiewicz, 1991).

Según Droby y Chalutz (1994), conocer el modo de acción de los antagonistas es importante por varias razones, entre las cuales destacamos:

- ◆ Para la optimización de los métodos y los momentos de aplicación de los antagonistas.

- ◆ Para el desarrollo de formulaciones apropiadas, porque proporciona una buena base para la selección de nuevos antagonistas efectivos.
- ◆ Para el registro de los agentes de biocontrol y su posterior uso comercial.

Numerosos conceptos sobre el modo de acción de los agentes de biocontrol de enfermedades en campo, se pueden aplicar también a los agentes de control biológico de enfermedades de postcosecha (Droby *et al.*, 1992).

### 1.2.1. Competencia de nutrientes y/o espacio.

El sistema de competición del antagonista con el patógeno por los nutrientes y el espacio, así como el modo de acción del antagonista ha sido estudiada por numerosos investigadores:

- ◆ La competición de nutrientes ha sido demostrada por *Pichia guilliermondii* en cultivo cuando el antagonista y el patógeno fueron co-cultivados en un medio mínimo artificial (Droby *et al.*, 1989).
- ◆ La rápida multiplicación y colonización de las células del antagonista en las heridas, comparadas con el patógeno, se ha demostrado en varias interacciones (Janisiewicz y Roitman, 1988; Droby *et al.*, 1989; Smilanick y Denis-Arrue, 1992).
- ◆ La adición exógena de nutrientes en la zona de interacción, que da como resultado un decrecimiento en la eficacia del antagonista (Droby *et al.*, 1989).
- ◆ El incremento de la eficacia de los agentes de biocontrol a bajas temperaturas, a las cuales el antagonista crece más rápido que el patógeno, se ha demostrado a nivel de laboratorio (Droby y Chalutz, 1994) y a gran escala (Droby *et al.*, 1993).

Los antagonistas que presentan el modo de competencia de nutrientes o espacio, generalmente están mejor adaptados a las condiciones adversas del medio que los patógenos. El antagonista debe demostrar un rápido crecimiento, ha de ser capaz de utilizar nutrientes a bajas concentraciones y sobrevivir y desarrollarse en la superficie del fruto, o en la zona de infección a bajas temperaturas y pH o condiciones osmóticas que no sean beneficiosas para el crecimiento del patógeno. Normalmente inhibe al patógeno pero no lo destruye (Wisniewski *et al.*, 1991).

Según Wicklow (1981) el término competencia se describe como un nicho entrecruzado en el que se demanda de forma simultánea alguno de los recursos por parte de dos o más poblaciones microbianas. La cantidad de espacio disponible generalmente no está limitado, pero si que ha de haber un número determinado de microhábitats apropiados que contienen nutrientes, en esta

situación puede darse competencia por el espacio utilizable mas que por el espacio total (Campbell, 1987).

Debido a su elevada relación superficie-volumen, las bacterias y las levaduras tienen la capacidad de absorber más rápidamente los nutrientes de soluciones diluidas que los tubos germinativos de los hongos filamentosos, pero en cambio en la absorción de determinados azúcares son más rápidos los hongos filamentosos (Brodie y Blakeman, 1976).

Droby *et al.*, (1989) demostró que la cepa US-7 de la levadura antagonista *Pichia guilliermondii* inhibe el desarrollo del patógeno *Penicillium digitatum* en un medio de cultivo sintético, dándose la competencia por los nutrientes entre el antagonista y el patógeno.

Estudios realizados sobre judías y tomates (Elad y Kirshner, 1992) muestran que hay un conjunto de bacterias y levaduras aisladas de estas plantas que controlan a *B. cinerea*, y que presentan el mismo sistema de acción de competencia de nutrientes.

Algunos microorganismos que tienen una elevada capacidad de crecimiento y de utilización de recursos pueden colonizar rápida y ampliamente el sustrato en el que se encuentran, excluyendo así otros microorganismos que lleguen posteriormente.

Si el mecanismo de actuación es por competencia de nutrientes, se ha de considerar como un primer requisito que el patógeno a controlar necesita los nutrientes antes de su penetración dentro del material vegetal y por tanto será en este momento cuando pueda presentarse el efecto antagónico, el período previo a la penetración no está necesariamente limitado por el proceso de germinación (Fokkema, 1976).

Los patógenos que normalmente penetran en el material vegetal, inmediatamente después de la germinación, son menos susceptibles a la competencia por nutrientes con el antagonista (Fokkema, 1976). Por eso se explica que *Botrytis squamosa*, que penetra en las hojas de la cebolla rápidamente, no se vea afectada por *Aureobasidium pullulans* mientras que *B. cinerea* queda inhibida por este antagonista (Fokkema y Lobeer, 1974).

Los antagonistas que tienen este tipo de actuación están mejor adaptados a las condiciones adversas del medio ambiente (temperatura, condiciones osmóticas, extremos nutricionales) que los patógenos.

El antagonista ha de mostrar un rápido crecimiento en las heridas y ha de ser capaz de utilizar nutrientes a bajas concentraciones, sobrevivir y desarrollarse en la superficie del fruto o en el lugar de la infección a bajas temperaturas, pH extremos o condiciones osmóticas que no son

beneficiosas para el crecimiento del patógeno. Normalmente en este tipo de antagonistas se inhibe el desarrollo del patógeno pero no se le destruye (Droby y Chalutz, 1994).

### **1.2.2. Inhibición del patógeno por secreción de antibióticos y otros mecanismos inhibidores.**

La inhibición del patógeno por secreción de antibióticos por parte del microorganismo antagónico es un fenómeno común en la naturaleza. Se considera que hay una producción de antibióticos cuando aparece una zona de inhibición entre el antagonista y el patógeno en un medio con agar, o una inhibición del crecimiento del patógeno en un medio líquido. Sin embargo, no hay una evidencia directa de que al observar este hecho y al mismo tiempo existir una interacción antagónica *in vivo* los antibióticos sean los responsables (Fokkema, 1976).

Muchos de los estudios recientes de antagonistas en control de enfermedades de postcosecha, se refieren a antibióticos producidos por antagonistas. No obstante, la aceptación de su aplicación sobre la fruta no ha sido todavía aprobada, principalmente por los efectos adversos de resistencia a antibióticos que se puede presentar en el ser humano y a que la inhibición del patógeno por un antibiótico es un salto directo a pérdidas de eficacia por el desarrollo de patógenos resistentes.

Algunos autores han estudiado el modo de acción y evaluación de la eficacia del antibiótico producido por bacterias, como *Bacillus subtilis* en laboratorio bajo condiciones semicomerciales (Pusey y Wilson, 1984; Arras, 1993).

La producción de ácidos grasos insaturados en levaduras, sustancias ácidas y ácido succínico de *Torulopsis utilis* tienen propiedades antibacteriales. Otros trabajos experimentales han demostrado que péptidos cíclicos de levaduras de panificación, así como proteínas y pirrolnitrina por parte de *Pseudomonas cepacia*, controlan el desarrollo de algunos patógenos en diferentes frutos, entre los que destaca *P. expansum* y *B. cinerea* en fruta de pepita (Janisiewicz y Roitman, 1988). Recientes estudios de Smilanick y Denis-Arrue (1992), determinan que las mismas sustancias pirrolnitrinas, producidas por *P. cepacia*, controlan a *P. digitatum* en el limón a pesar del desarrollo antibiótico-resistencia del patógeno.

Manzanas y peras tratadas con bajas dosis de pirrolnitrina muestran una importante reducción de la podredumbre causada por *P. expansum* y *B. cinerea*. Smilanick y Denis-Arrue (1992), en estudios posteriores se cuestionan el papel de la pirrolnitrina en el control de *P. digitatum* en cítricos, ya que consiguieron controlar mediante la aplicación de *P. cepacia* cepas de estos hongos resistentes a la pirrolnitrina. Estos resultados sugieren la existencia de otros mecanismos de acción implicados.

Hajlaoni *et al.* (1992) observaron que *Stephanoascus flocculosus*, producía compuestos

antifúngicos según el medio de cultivo en el que se encontraba. Los bioensayos realizados con el extracto de diclorometano obtenido de cultivos filtrados de *S. flocculosus* mostraron un gran efecto inhibitorio en la germinación y crecimiento del micelio de *Cladosporium cucumerinum*.

La inhibición de patógenos por medio de secreción de antibióticos por parte de microorganismos antagonistas tiene un importante papel en la protección de enfermedades de postcosecha en cítricos (Wilson y Chalutz, 1989), en los cuales se ha observado que un gran número de microorganismos epifitos inoculados en la superficie de estos frutos inhibían al patógeno.

Los antibióticos producidos por los antagonistas deben ser efectivos frente a posibles infecciones en heridas, que es uno de los principales problemas que presenta la fruta en el mercado para poder justificar su utilización comercial (Chalutz y Droby, 1997).

### 1.2.3. Inducción de procesos de resistencia en el huésped.

El mecanismo de resistencia del huésped frente al patógeno en frutas y vegetales ha sido poco estudiado, ya puesto que está generalmente asumido que durante el proceso de senescencia se reduce la resistencia de la fruta.

El incremento de la producción de etileno, fenilalanina y actividad amonio-liasa en cítricos y otras frutas y vegetales tras la aplicación de las células antagonistas, ha sugerido la inducción de procesos de resistencia en la superficie del huésped (Droby y Chalutz, 1994). Por eso, se identificó la acumulación de compuestos antifúngicos como scoparona y scopoletina en la superficie de cítricos tratados con levaduras (Rodov *et al.*, 1994). Otro caso es el antagonista *Candida saitoana* que induce la enzima citinasa, conocida por el rol que juega en la defensa de la planta frente a patógenos.

Durante la interacción del agente de biocontrol y el huésped, se han observado procesos de desarrollo de resistencia en el huésped que provocan cambios químicos y/u osmóticos a favor del antagonista y contra el patógeno (McLaughlin *et al.*, 1990).

Los metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos pueden llevar a procesos de resistencia en el huésped, con la producción de sustancias inhibitorias. En estos casos no se elimina al patógeno en su totalidad (Schönbeck y Dehne, 1988).

Después de inocular una suspensión de células de la levadura antagonista *Pichia guilliermondii* (cepa US-7) en la superficie de cítricos aumentó la producción de etileno, fenómeno que no se observa cuando no hay antagonista en la herida (Wilson *et al.*, 1991).

Al aplicar cepas no virulentas de *Erwinia herbicola* o *Pseudomonas tabaci* sobre brácteas jóvenes de manzanos se protegen del ataque de *E. amylovora*, lo que hace pensar que la protección es debida a la estimulación de defensas del huésped (Goodman, 1967; Wrather *et al.*, 1973).

#### 1.2.4. Interacción directa con el patógeno.

Adams y Ayers (1979) concluyeron que existen microparásitos agresivos y pasivos. Los pasivos pueden considerarse como potenciales agentes de biocontrol cuando se aplican en nichos ecológicos muy especiales.

Antagonistas fúngicos como *Trichoderma* spp. atacan a los patógenos por parasitismo directo o produciendo antibióticos. La levadura *Pichia guilliermondii* (cepa US-7) ataca el micelio del patógeno *Botrytis* spp (Wilson *et al.*, 1991), por un bloqueo de la respiración y alteración de la integridad de las proteínas. Por otro lado, *P. guilliermondii* tiene una alta actividad  $\beta$ -1-3-glucanasa, que se asocia con la degradación de la pared celular del patógeno (Wisniewski *et al.*, 1991; Drobey *et al.*, 1993).

Muchas bacterias inhiben el crecimiento del hongo por la lisis de sus esporas, tubos germinativos o hifas. Un ejemplo es *Bacillus pumilus* que actúa sobre los tubos germinativos después de un tratamiento en autoclave, lo cual indica que el agente de la lisis no es una enzima (Blakeman y Brodie, 1976).

#### 1.2.5. Efecto del pH.

Un pH inadecuado en el sitio de acción del agente patógeno puede inhibir su desarrollo. Newhook (1951) observó que en los orificios colonizados por antagonistas y el patógeno a ensayar, los valores de pH oscilaban entre 7,4 y 7,8. Mientras que en los orificios control en los que solamente había *B. cinerea*, los valores de pH oscilaban entre 6,8 y 7,2; por lo que se cree que el incremento de pH tiene un efecto directo sobre el crecimiento de *B. cinerea* e indirectamente un efecto de disminución de la producción de pectinasas (Newhook, 1951).

Bhatt y Vaughan (1963) mostraron el efecto del pH a partir de unos estudios con *Cladosporium* spp. como antagonista en flores jóvenes, el cual producía una potente sustancia inhibidora en un medio con agar, pero al mismo tiempo incrementaba el valor del pH hasta 8.

La producción de ácido por parte de algunos microorganismos epifitas puede dar lugar a unas condiciones desfavorables para el crecimiento de los patógenos (Blakeman y Brodie, 1976).

### 1.3. Características deseables en un agente de biocontrol.

Para seleccionar un microorganismo como agente para control biológico en postcosecha, además de estudiar su poder inhibitorio, se deben tener en cuenta otras características (Wisniewski y Wilson, 1992):

- Estabilidad genética;

- Efectividad a bajas concentraciones;
- Poca exigencia en cuanto a requerimientos nutritivos;
- Capacidad de sobrevivir bajo condiciones adversas (almacenamiento en frío y bajo condiciones controladas);
- Efectividad contra varios patógenos y en diversos frutos y vegetales;
- Capacidad de reproducción en medios de crecimiento económicos;
- Formulación estable;
- Facilidad de aplicación;
- No producción de metabolitos secundarios tóxicos para las personas o animales;
- Resistencia a los pesticidas y fungicidas más utilizados;
- Compatibilidad con otros tratamientos químicos o físicos;
- No tóxicos para el huésped.

Según Roberts (1991) todo antagonista en potencia debe tener la habilidad de colonizar y persistir con comodidad a niveles efectivos, ser compatible con otras prácticas, procesos y productos químicos de postcosecha, ser efectivo a bajas temperaturas y en algunos casos en condiciones de atmósfera controlada. Además, el microorganismo debe tener capacidad de reproducirse a gran escala, utilizando productos de bajo coste. Si se cumplen estas premisas los microorganismos serán potencialmente comercializables para el control de enfermedades.

La mayor parte de los patógenos de la fruta de postcosecha son y dependen de los nutrientes exógenos para su germinación y para iniciar el proceso de infestación. Los antagonistas que puedan utilizar rápidamente estos nutrientes base serán capaces de alcanzar este proceso de infestación (Janisiewicz, 1991).

La supervivencia del antagonista en el hábitat, a las condiciones ambientales a las cuales debe proteger el material vegetal, será uno de los principales factores que determinen su utilidad como agente de biocontrol. En el caso de la postcosecha, el antagonista debe sobrevivir y conservar su efectividad después de someterlo a tratamientos de postcosecha y a condiciones de almacenamiento, como humedad relativa, temperaturas bajas y diversas relaciones de  $O_2/CO_2$  (Janisiewicz, 1991). Las levaduras pueden crecer y sobrevivir sin agua libre si tienen una humedad relativa alta en la atmósfera, además, las bajas temperaturas pueden permitir una buena supervivencia del antagonista pero disminuir su efectividad.

Todas estas características deseables para un agente de biocontrol es muy difícil que las reúna un

solo microorganismo, por lo que se ha de trabajar incorporando en un mismo organismo aptitudes de otros mediante ingeniería genética (Panopoulos, 1986).

Otro factor importante para la lucha contra el patógeno es la relación entre la concentración del inoculo del antagonista y el agente causante de podredumbres, así como el tiempo transcurrido entre la aplicación del antagonista y el inóculo del patógeno (Jijakli y Lepoivre, 1992). Se ha demostrado que la actividad antagónica de los agentes de biocontrol depende del tiempo de incubación antes de la inoculación del patógeno, así se sugiere que la colonización de la superficie a proteger por parte del antagonista es un requisito para la protección del tejido (Jijakli *et al.*, 1993).

Se han testado microorganismos para enfermedades de postcosecha para frutas económicamente importantes (Droby y Chalutz, 1994), que incluye manzanas, albaricoques, aguacates, bananas, zanahorias, col, cerezas, ciruelas, cítricos, uvas, kiwis, mangos, nectarinas, peras, melocotones, piñas, patatas, rosas, fresas, tomates, tulipanes cebollas, patata dulce y litchi (Chalutz y Droby, 1997).

## **1.4. Etapas de un programa para la obtención de antagonistas.**

### **1.4.1. Aislamiento de los microorganismos.**

La primera fase corresponde a la recogida masiva de los posibles antagonistas para que posteriormente, sean testados con el fin de conocer su potencial capacidad inhibidora de los principales patógenos.

### **1.4.2. Selección de los microorganismos.**

Una vez que han sido aislados los microorganismos, la fase siguiente corresponde a la selección de los mejores antagonistas mediante la realización de diversos sistemas de testaje en fruta. Con ello se desea evaluar la capacidad del microorganismo de interferir en el crecimiento del patógeno, o bien, reducir el desarrollo de la enfermedad.

Estos sistemas son de dos tipos: *in vitro* e *in vivo*. Mediante estos ensayos se pretende determinar en un principio la existencia de capacidad antagónica, y una vez conocida, se estudia la concentración mínima del antagonista que inhibe a los principales patógenos.

### **1.4.3. Pruebas posteriores.**

Después de evaluar la capacidad inhibidora, el siguiente paso es estudiar de forma exhaustiva al microorganismo antagonista determinando su biología, los mecanismos de inhibición, su posible toxicidad, su compatibilidad con otros sistemas de lucha, su adaptación a las condiciones ambientales (en el caso de postcosecha a las condiciones de frío convencional y de atmósfera

controlada), etc. El objetivo de todas estas pruebas es potenciar la acción antagónica detectada y/o aumentar el espectro de acción (inhibiendo a otros patógenos o protegiendo a otro tipo de fruta o vegetal).

Estos ensayos se recomienda realizarlos a pequeña escala para, posteriormente realizarlos a escala comercial (Janisiewicz, 1991).

### 1.5. La flora microbiana y los posibles agentes de biocontrol.

La superficie externa de las plantas está colonizada por una microflora característica que consiste en bacterias, levaduras y hongos filamentosos, algunos microorganismos representantes de cada grupo pueden encontrarse en cualquier época del año, existiendo una sucesión estacional (Blakeman, 1985).

La microflora asociada a las plantas varía durante las diferentes épocas del año y su localización geográfica (Blakeman, 1985). Las variaciones de temperatura y humedad relativa, así como la duración y la intensidad de la luz, son las condiciones ambientales que influyen en su desarrollo y no son siempre las más adecuadas para todos los tipos de microorganismos.

Durante las primeras etapas de desarrollo de botones florales, cuando la humedad es elevada y la temperatura es moderada, predominan las bacterias; durante las etapas de floración, cuajado y crecimiento de la fruta aumenta la población de levaduras y disminuye la de bacterias (Blakeman, 1985) (Figura 1).

Durante la maduración de las frutas, las levaduras y los hongos son los que predominan (Blakeman, 1991).

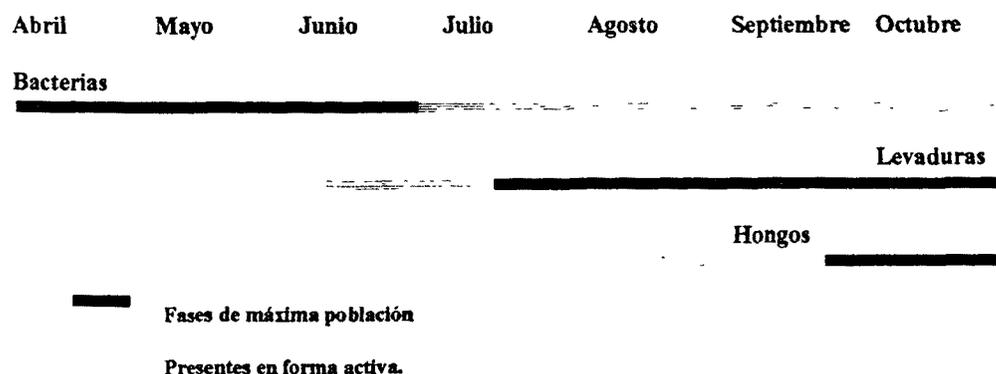


Figura 1: Fases dominantes de los principales grupos de microorganismos en hojas de plantas herbáceas y leñosas caducifolias, en un clima temperado de una zona del hemisferio norte (Blakeman, 1985).

A partir de que Leben (1985) demostrara que había una relación importante entre la microflora epifita del vegetal y sus enfermedades se han realizado un gran número de estudios para conocer

las comunidades microbianas asociadas a las diferentes superficies vegetales. La mayoría de investigaciones se han centrado en las hojas (Preece y Dickinson, 1971; Dickinson y Preece, 1976; Blakeman, 1981; Pennycook y Newhook, 1981). En cambio son pocos los estudios referidos a otros órganos vegetales como los botones florales (Leben, 1985) o las frutas (Davenport, 1976; Bizeau *et al.*, 1990).

El factor que más influencia tiene en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en su hábitat natural es la humedad relativa en la superficie de las plantas, por lo que para mantener el crecimiento de muchos microorganismos la superficie de las plantas debe estar mojada y con una humedad relativa superior al 95 % (Blakeman, 1985).

En general, el crecimiento de bacterias y hongos es máximo en el rango de -3 a-5 bares de potencial de agua y se frena en valores de -40 a -50. Las bacterias generalmente necesitan valores mayores de potencial de agua, en cambio, algunos mohos como *Penicillium* spp. pueden crecer con un potencial de agua por debajo de -200 a -250 bares (Cook y Papendik, 1978).

El tipo de sustrato, y sus características intrínsecas condicionarán la microflora que se pueda presentar. En el caso de las frutas podemos destacar su actividad de agua, la disponibilidad de ciertos nutrientes (Marshall y Walkley, 1951). Referente al pH del medio, sustratos más ácidos hacen que en las frutas se favorezca la presencia de levaduras y mohos, mientras que, se da una mayor presencia de bacterias en las partes vegetativas de las plantas con pH más básicos.

Dentro de un mismo árbol existen diferentes microclimas, que ligados a la proximidad de las posibles fuentes de inóculo, como puede ser el suelo, harán que se encuentren diferencias en los tipos y cantidades de microorganismos en las diferentes zonas del árbol (Andrews *et al.*, 1980).

Según Blakeman (1985) las principales fuentes de inóculo de microorganismos en los árboles de hoja caducifolia son el laboreo, el suelo y el aire. Las bacterias utilizan las tres vías para colonizar las plantas, los mohos son transportados básicamente por el aire hasta la superficie de la planta y las levaduras, además de ser transportadas por el aire, aprovechan la penetración del agua de lluvia para entrar en contacto con la planta.

Los botones florales contienen una importante población de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, pero la densidad de estas poblaciones decrece rápidamente cuando se abren los mismos y los rosetones de pétalos comienzan a desplegarse (Pennycook y Newhook, 1981).

Estudios realizados por Bowen y Beech (1967) muestran que un gran número de especies de levaduras están presentes en las manzanas y se incrementan progresivamente cuando la fruta es recogida y almacenada. Eso se puede atribuir tanto a la multiplicación de las levaduras en frutas como a una posterior contaminación durante la recogida y almacenamiento.

Otra zona de la planta de importancia para explorar son las áreas nectarías de las flores, que son a menudo colonizadas por levaduras tolerantes a los azúcares, también los microorganismos utilizados en la biopreservación de alimentos y en el desarrollo de varios productos alimentarios (Pusey y Robins, 1991).

Después del aislamiento y selección de potenciales antagonistas a través de *screenings* primarios, con lo que de todos los aislados se reducen a un 15-20 %, se realizan testajes secundarios de efectividad para desarrollar y determinar la mínima concentración efectiva del potencial antagonista (Janisiewicz, 1991). Un 1 - 3 % de los antes aislados pasan la prueba del *screening secundario*. Es importante la concentración conidial del patógeno utilizado en estas pruebas, que debe estar relacionada con las condiciones comerciales de envasado y la concentración mínima efectiva de los antagonistas, determinada con varios niveles de inoculos del patógeno.

La concentración mínima efectiva es diferente entre bacterias y levaduras, porque la biomasa de las levaduras es 50-100 veces la de las bacterias. En la práctica, hay una concentración elevada límite para el control de patógenos y que en bacterias está alrededor de  $10^9$  ufc/ml y en levaduras en  $5 \cdot 10^7$  ufc/ml.

## 1.6. Bacterias y levaduras como posibles agentes de biocontrol.

Muchos investigadores han aislado los microorganismos propios de la superficie de la fruta y de vegetales que quieren proteger, para ensayarlos como posibles agentes de biocontrol (Janisiewicz, 1988b; Moline, 1991). El hecho de que los candidatos a antagonistas estén de forma natural en el huésped, sugiere que tienen una mayor habilidad en colonizar de forma más efectiva las frutas y vegetales. Es razonable pensar que pueden ser buenos agentes de biocontrol, ya que estarán adaptados al huésped y a su ambiente (Chalutz y Wilson, 1990).

El aislamiento del antagonista durante la fase de crecimiento se debe hacer especialmente en el período cercano a la cosecha, porque las estrategias de control requieren la aplicación del antagonista en la fruta inmediatamente después de la cosecha (Janisiewicz, 1988a) o durante el tiempo de almacenamiento en frigoconservación. Strecht (1989) aisló más microorganismos con capacidad antagónica contra las podredumbres de frambuesa de bosque en la superficie de las frutas durante el período frío del año.

No se encontró relación entre el origen del antagonista y su efectividad en controlar algunos patógenos foliares; Andrews (1985) sugiere que hay muchos microorganismos no presentes en las plantas que podrían colonizarlas pero en condiciones favorables.

Smilanick (1994) indica que hay otras fuentes de obtención de microorganismos para ensayarlos como agentes de biocontrol:

- Microorganismos que han mostrado capacidad antagónica en otros huéspedes.
- Agentes conocidos como los causantes de fermentaciones comerciales.
- Patógenos con virulencia debilitada.

La mayoría de los antagonistas de postcosecha de fruta son bacterias gram negativas no productoras de antibióticos y levaduras (Janisiewicz, 1997).

Las frutas son un medio rico en nutrientes y tienen un elevado contenido en agua por lo cual proporcionan un buen desarrollo de los microorganismos tanto parásitos como saprofitos. Además la superficie de la fruta puede contener depósitos de polen, restos orgánicos, que suplementan significativamente la cantidad de alimentos necesarios para los microorganismos (Blakeman, 1985). Por tanto no es sorprendente que cuando otros factores ambientales como la temperatura y la humedad sean favorables, los microorganismos se multipliquen rápidamente en la superficie de la fruta.

La microflora difiere también según sea la parte examinada, la estación, el cultivar y el lugar. Algunos grupos de levaduras son comunes en todas las etapas de desarrollo de las manzanas. Deák (1991) en sus estudios señala las principales especies de levaduras presentes de forma permanente en manzanas: *Haseniaspora uvarum*, *Debaryomyces hansenii*, *Sporobolomyces roseus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus albidus*, junto con fases de levaduras de *Cladosporium herbarum* y *Aureobasidium pullulans*. Pero además, hay un gran número de especies que pueden considerarse como miembros transitorios de la microflora.

En manzanas “Grenadier” las poblaciones acéticas y lácticas disminuyen con el incremento de las poblaciones de levaduras durante el desarrollo, siendo la causa de esta inhibición la secreción de ácidos grasos insaturados (Last y Price, 1969).

### **1.7. Incremento de la eficacia de los agentes de biocontrol en enfermedades de postcosecha.**

En general la mayor efectividad obtenida en los agentes de biocontrol no llega a los niveles obtenidos por los fungicidas sintéticos y químicos, particularmente en infecciones latentes. Así que el incremento de la eficacia de los agentes de biocontrol es un objetivo inmediato para aumentar su uso.

Pusey (1994) discute la posibilidad de incrementar la población y actividad de los antagonistas por la manipulación de las condiciones físicas y químicas ambientales, o por manipulación genética de las plantas.

Rapidez, eficiencia y efectividad/coste en la producción de antagonistas, usualmente por

fermentación es la clave del tema (Hofstein *et al.*, 1994). Esto se debe a que la eficacia de la mayoría de los antagonistas está directamente relacionada con la cantidad del microorganismo aplicado (Chalutz y Wilson, 1990; Hofstein *et al.*, 1994). Por tanto una vía para incrementar la eficacia es por aplicación de un gran número de células antagonistas.

Otro punto a considerar es el momento, modo y medio de aplicación del antagonista en los productos. La aplicación se puede hacer en medio líquido o por encerado, así *Bacillus subtilis*, bacteria antagonista, es compatible con las ceras comerciales (Pusey *et al.*, 1986).

Se puede mejorar la efectividad de los agentes de biocontrol también por la adición de varios nutrientes en la formulación, que son eficazmente utilizados por el antagonista y escasamente por el patógeno, esto se ha sugerido en algunas interacciones antagonista-patógeno (Janisiewicz, 1988b; Janisiewicz y Roitman, 1988).

Se ha encontrado que la adición de sales de calcio mejoran la actividad de muchas levaduras antagonistas en diferentes enfermedades de postcosecha (McLaughlin *et al.*, 1990; Chalutz *et al.*, 1992). Muchos aditivos alimentarios comúnmente usados como aditivos de comidas pueden mejorar la actividad de algunos agentes de biocontrol (Chalutz y Droby, 1997).

Con los últimos avances de las técnicas de biología molecular se estudia el mejorar la acción de los agentes de biocontrol a través de manipulaciones genéticas, pero primero se debe entender el modo de acción de los antagonistas. Otra vía más viable es la combinación de procedimientos de biocontrol con procedimientos químicos o físicos de control de enfermedades. Por ejemplo, la eficacia del biocontrol de levaduras antagonistas frente a podredumbres causadas por hongos en cítricos, fue incrementada por la adición en la preparación de la levadura antagonista de pequeñas concentraciones de imazalil o tiabendazol, que son fungicidas químicos (Droby *et al.*, 1993, Hofstein *et al.*, 1994). Del mismo modo, *B. subtilis* fue compatible con diclorán usado para el control de las podredumbres causadas por *Rhizopus* (Pusey *et al.*, 1986).

Otra posibilidad de mejorar la eficacia de los agentes de biocontrol es a través de la complementación con procedimientos físicos de curado o tratamientos en caliente, luz ultravioleta (Chalutz *et al.*, 1992; Droby *et al.* 1993, Wilson *et al.*, 1994) o con productos naturales derivados de animales o plantas (Aharoni *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1994) o a través de la combinación con atmósferas controladas y almacenaje en frío. El incremento de la eficacia es probablemente debida a la mejor adaptación del antagonista a las bajas temperaturas frente a la del patógeno (Chalutz y Droby, 1997).

## 1.8. Situación actual del control biológico.

La utilización de microorganismos antagonistas presentes de forma natural en la superficie de los

frutos o de los materiales vegetales está siendo una alternativa prometedora en la protección de las frutas contra las enfermedades de postcosecha. En la Tabla 1 están descritos algunos ejemplos de los éxitos obtenidos en la búsqueda de agentes de biocontrol para los patógenos en manzanas.

Una de la partes pendientes que queda por aclarar en la mayoría de los agentes de biocontrol recientemente descubiertos es la determinación de su modo de actuación, el hecho de ser muy complejos hace que pocos de los estudios que se están realizando sean concluyentes (Wilson *et al.*, 1991; Smilanick y Denis-Arrue, 1992).

**Tabla 1: Antagonistas en el control de los principales patógenos de postcosecha de manzanas.**

ENFERMEDAD	PATÓGENO	AGENTE DE BIOCONTROL	REFERENCIA
Podredumbre azul	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Janisiewicz, 1987
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz y Roitman, 1988
		<i>Cryptococcus spp.</i>	Roberts, 1991
			Wilson <i>et al.</i> , 1993
		<i>Pichia guilliermondii</i>	McLaughlin <i>et al.</i> , 1990
		<i>Candida sake</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1993
		<i>Sporobolomyces roseus</i>	Janisiewicz y Bors, 1995
	<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas <i>et al.</i> , 1997	
Podredumbre gris	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	Wisniewski <i>et al.</i> , 1988
			McLaughlin <i>et al.</i> , 1990
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Janisiewicz y Roitman, 1988
		<i>Cryptococcus laurentii</i>	Roberts, 1990
		<i>Acremonium breve</i>	Janisiewicz, 1988b
	<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas <i>et al.</i> , 1997	
Podredumbre por <i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Candida sake</i> CPA-1	Viñas <i>et al.</i> , 1997

Los sistemas de control biológico que se quieren ensayar como una alternativa real se han de

comparar con los fungicidas sintéticos en términos de efectividad y de confianza (Hofstein *et al.*, 1994). Una vez determinada la efectividad de los antagonistas a temperatura ambiente, es muy importante estudiar su comportamiento a bajas temperaturas y a las condiciones de atmósfera controlada (Falconi y Mendgen, 1991).

La mayoría de agentes de biocontrol se han ensayado solamente contra un pequeño número de patógenos y en variedades muy concretas. Actualmente, se comienzan a dedicar más esfuerzos para identificar antagonistas con un amplio espectro de acción contra varias enfermedades y en diferentes variedades (Arul, 1994). Se están realizando muchos estudios para mejorar la capacidad antagónica de los agentes de biocontrol ya descubiertos, como son la adición de nutrientes (Janisiewicz *et al.*, 1992) o la combinación con otros sistemas de lucha (El-Ghaouth y Wilson, 1995). También se está dedicando muchos esfuerzos para empezar a trabajar en su manipulación genética (Pusey, 1994).

Analistas de negocios e industrias de pesticidas están de acuerdo en que la transición desde el control químico a biológico se presenta de forma gradual y es inevitable. Algunos estudios indican que desde 1990 hasta finales de siglo, el volumen anual de ventas de pesticidas biológicos a los países más ricos crecerá desde los 33-45 millones de dólares a los 8 billones de dólares (Woodhead *et al.*, 1990).

Un hecho muy importante que está favoreciendo la aparición de agentes de biocontrol en los mercados, es el desarrollo de un producto químico de síntesis con las legislaciones medioambientales actuales de los E.E.U.U. tarda entre 8-12 años, con un coste aproximado que va entre los 40-80 millones de dólares. En cambio solamente se necesitan invertir 3 años y un costo de unos 5 millones de dólares para poder entrar al mercado un agente de biocontrol, sin tener en cuenta el tiempo que tarda en descubrirse (Woodhead *et al.*, 1990).

A pesar de que ya hace tiempo que se está investigando sobre el control biológico, ahora está tomando nueva fuerza la patentabilidad, registro y comercialización. Así tenemos ejemplos de patentes concedidas para el control de enfermedades en postcosecha, la mayoría son de los E.E.U.U., aunque cabe destacar en Europa la patente de *Candida sake* CPA-1 para el control de enfermedades de postcosecha de fruta (Viñas *et al.*, 1997).

Tras la obtención de la patente, se procede a registrar el producto. Actualmente en España y en el resto de países de la UE, este paso representa un obstáculo importante para la comercialización de los agentes de biocontrol de postcosecha. La directiva que regula el registro de agentes de biocontrol es la 91/4/14/CEE, en la cual se definen todos los ensayos a realizar. Pero en los agentes de biocontrol no es necesario hacer la toxicología crónica a diferencia de lo que pasa con los productos químicos. De todas maneras hay un gran número de estudios a realizar que encarecen el

proceso y lo dificultan, algunos de los cuales son propios de productos químicos.

En el caso de los E.E.U.U. ya existe una normativa específica de registro de agentes de biocontrol. El coste de un ensayo de toxicología va entre 80.000 y 150.000 dólares y se pueden realizar en seis meses; en cambio los estudios toxicológicos para un producto químico de síntesis pueden costar entre 2,5 y 3 millones de dólares y se necesitan de 4.5 a 6 años para realizarlos (Woodhead *et al.*, 1990).

Esta gran diferencia de costes y tiempo es principalmente causada por el gran interés por parte de la E.A.P. (Agencia de Protección Medioambiental de los E.E.U.U.) en facilitar la aparición de pesticidas biológicos. Este hecho ha determinado la aparición en el mercado de algunos productos biológicos para el control de enfermedades de postcosecha de fruta: el Bio-save 10 y 11 (*Pseudomonas syringae* cepa ESC30 y ESC11, Ecoscience Corp., Worcester, MA) y el Aspire (*Candida oleophila* cepa 182, Ecogen INC., Langhome, PA) (Koch, 1996).

## **1.9. Comercialización de agentes de biocontrol.**

Para registrar un agente de biocontrol para su comercialización debe ser testado a gran escala. Sin embargo, el registro no es tan caro ni tan largo como un fungicida químico. Se debe considerar que las experiencias a gran escala se hacen sobre fruta en un grado de calidad comparable al cual se comercializa y en grandes cantidades, por lo que la producción y formulación de un agente de biocontrol generalmente es realizada por asociaciones o compañías privadas, todo con la esperanza de que el producto sea utilizable a gran escala en un futuro cercano (Chalutz y Droby, 1997).

## **1.10. Las levaduras como agentes de biocontrol.**

Las levaduras en contraste con los hongos filamentosos pueden utilizar muchos nutrientes, multiplicarse y colonizar las superficies rápidamente, inhibiendo así más fácilmente el crecimiento de los patógenos; por lo que para el desarrollo de poblaciones de levaduras en las hojas es necesaria la existencia de unos adecuados niveles de azúcares simples (Blakeman, 1985). Por otra parte, si hay una gran presencia de azúcares las levaduras pueden incorporar gran cantidad de sustrato en forma de polisacáridos extracelulares; dicha característica aumenta su capacidad de tomar otros nutrientes como los aminoácidos, provocando un incremento de la competencia por éstos. Esta elevada competencia podría ser la causa del descenso de las poblaciones bacterianas observadas cuando hay presencia de azúcar en las hojas (Paton, 1960).

Las colonias de levaduras que se desarrollan en las hojas son el resultado de la colonización de inoculos transmitidos por el aire. No existe una transferencia directa de levaduras desde las hojas viejas a la jóvenes, por lo cual todas las hojas nuevas se encuentran inicialmente libres de levaduras (Fokkema *et al.*, 1979). Otra propiedad de las levaduras es que pueden continuar la

colonización en períodos prolongados de sequedad y de altas temperaturas (Fokkema *et al.*, 1979).

No todos los grupos de antagonistas son potencialmente efectivos contra todo tipo de patógenos, así por ejemplo, las levaduras *a priori* son más adecuadas para el control de patógenos saprofitos que para los que tienen una fase saprofítica muy reducida y por tanto bajos requerimientos de nutrientes exógenos. Esto se debe a que las levaduras tienen como principal mecanismo de actuación la competencia de nutrientes.

La microflora de la superficie de la fruta puede penetrar hacia el interior de la pulpa si el tejido está dañado, este puede ser colonizado rápidamente sobre todo por levaduras cuando no están infectadas por patógenos (Marshall y Walkley, 1951).

Las levaduras tienen algunas características específicas que permiten considerarlas como buenos candidatos para el biocontrol de enfermedades de frutas (Janisiewicz, 1991):

- Tienen una proporción favorable de la relación superficie/volumen, en claro contraste con los hongos miceliares. Esta característica permite a las levaduras utilizar de forma rápida los nutrientes disponibles, lo que le permite incrementar el número y colonizar la superficie vegetal durante largos períodos, constituyendo las heridas del fruto un hábitat perfecto por ser un medio húmedo, rico en nutrientes, elevado contenido en azúcares y bajo pH, entre otros.
- Pueden colonizar las superficies vegetales durante largos períodos de tiempo, hasta condiciones de sequedad, llegando a sobrevivir sin agua libre si tienen la humedad relativa alta en la atmósfera.
- Pueden crecer a temperaturas bajo cero. Hay levaduras que pueden ser activas a las más bajas temperaturas de almacenamiento (-1 °C) de la fruta.
- Producen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que intensifican su supervivencia.
- Son afectados mínimamente por plaguicidas.
- El consumidor acepta más fácilmente la utilización de levaduras que bacterias en los productos alimentarios.

Las levaduras han sido estudiadas durante varias décadas como agentes de biocontrol frente a enfermedades de frutas.

La fruta herida en particular necesita protección, porque las heridas son los sitios primarios para la infección de muchos hongos patógenos de postcosecha, incluyendo a *Botrytis cinerea*, como el agente causal del moho gris. *Cryptococcus laurentii* (Kufferat) Skinner, *Pichia guilliermondii* Wicherham (originalmente identificada como *Debaryomyces hansenii* (Zopf), *Sporobolomyces roseus* Kluyver & Niel y *Candida oleophila* Montrocher y *C. sake* (Roberts, 1990; Viñas *et al.*,

1997), se han mostrado efectivos frente al moho gris de la manzana.

El conocimiento del mecanismo del antagonista operativo en el biocontrol puede ser provechoso para incrementar la eficacia del mismo en el biocontrol de las levaduras, pero han sido pocos los estudios referentes a dichos mecanismos.

Entre los mecanismos antagonistas usados por las levaduras en el biocontrol del moho gris se distinguen tres: el apropiarse y excluir al hongo del sitio de infección, la competición de nutrientes (Roberts, 1990), y el microparasitismo (Wisniewski *et al.*, 1991).

Las levaduras son aisladas de varios hábitats, como diferentes partes de la planta, de árboles o del suelo, incluso de las frutas como *Candida humicola* Y1266. Se consideran potenciales agentes de biocontrol que son experimentados a diferentes grados de concentración para elucidar su efectividad y determinar su mecanismo de acción como agente antagonista. Varias investigaciones (Filonow *et al.*, 1996) indican que algunas levaduras se multiplican rápidamente en las heridas de las manzanas, con una rápida utilización de nutrientes, aumentando su concentración en la herida y ejerciendo el biocontrol.

Otro dato importante es el uso de forma rápida de sacarosa y otros azúcares, por parte de las levaduras con capacidad de biocontrol, frente a *B. cinerea*, dejando bajas las concentraciones de azúcares y nutrientes necesarios para la germinación conidial, realizando así el biocontrol (Filonow *et al.*, 1996).

En otras experiencias se han encontrado evidencias de antibiosis, es decir, metabolitos antifúngicos producidos por la levadura en la herida de la fruta que tienen un efecto inhibitorio en la germinación conidial, como es el caso de *Candida albindus* 10666 (Filonow *et al.*, 1996).

## 2. Las levaduras.

### 2.1. Características generales .

Las levaduras son filogenéticamente un grupo diverso de hongos unicelulares en los cuales las fases teleomorfas o sexuales de división celular se dan por fisión o gemación (Lodeer 1970; Kurtzman, 1990).

La estructura celular de las levaduras es de tipo eucariótico pero sin sistema fotosintético, con pared rígida que se caracteriza por la presencia en su composición de dos polisacáridos: el manano y el glucano. Algunas levaduras producen una cápsula constituida por fosfomananos. El núcleo está rodeado de una membrana que persiste durante la división celular. El número de cromosomas es variable (Reed y Nagodawithana, 1991).

Las levaduras dentro del grupo de microorganismos tienen un papel muy importante en la

producción y deterioro de los alimentos, tecnológicamente son los responsables e intervienen en la fabricación de tres de los alimentos más comercializados como son: el pan, el vino y la cerveza (Boekhout y Kutzman, 1996). Las levaduras comúnmente utilizadas en la industria son las que corresponden a los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces*, de las cuales *Saccharomyces* tiene más importancia comercial (Kurtzman, 1990).

En el hábitat natural, las levaduras se adaptan al crecimiento sobre medios que contengan azúcares como los existentes en frutas maduras o exudados de árboles formando parte del ecosistema. Actualmente, se están investigando como agentes de biocontrol contra otras enfermedades (Reed y Nagodawithana, 1991).

Según Reed (1981) y Pepler (1983) las levaduras desde el punto de vista de la industria alimentaria se pueden clasificar en siete grupos:

- Levaduras de panadería y productos de panificación;
- Levaduras de cervecería y cerveza;
- Levaduras de vinificación y vino;
- Levaduras de destilación y licores;
- Levaduras - alimentos;
- Productos derivados de las levaduras (autolisados, etc.);
- Producción de etanol industrial y carburantes.

Las levaduras son objeto de creciente interés en el campo de los alimentos por su aportación en el aspecto nutritivo y aromático (Dziezak, 1987). En las últimas décadas se están incluyendo como importante fuente de investigación y aplicación como agentes de biocontrol en enfermedades de plantas y frutas.

Desde 1970 ha habido la necesidad de adicionar cepas en la industria de la panificación, las cuales deben cumplir ciertos requisitos como: levaduras con mejorada capacidad fermentativa que pueda actuar bien en elevadas concentraciones de azúcares en masas de pan, y en masas congeladas (Reed y Nagodawithana, 1991), alta actividad maltasa y alta actividad leudante (Solingen y van der Plaats, 1977).

Las levaduras para fermentación de líquidos deben tener una alta tolerancia al alcohol, dar una buena producción, fermentar rápidamente, tener un mínimo riesgo de contaminación, así como, producir la concentración adecuada de los aromas deseados en las bebidas producidas (Ward, 1989).

Para este propósito se han utilizado algunos métodos como el de inhibición nutricional y fusión

protoplasmática. En los últimos años gracias a la ingeniería genética el DNA se modifica según las necesidades de la nueva cepa a sintetizar a través de la inserción de genes para la formación de una o más enzimas necesarias para la ruta de la glucólisis, a fin de incrementar la actividad fermentativa (Schaaf, 1988) Por ejemplo se han insertado genes de levaduras que sintetizan amilasas con capacidad fermentativa de almidón en levaduras de cervecería sin esta capacidad (McCann y Barnett, 1986), dado que la hidrólisis del almidón y dextrinas es de crítica importancia en la industria cervecera, creándose cepas de *Saccharomyces diastaticus* con capacidad amiloláctica (Bannerjee *et al.*, 1988).

Técnicas de fusión protoplasmática han sido utilizadas para levaduras de cervecería y panificación con el fin de incorporar características de osmotolerancia a altas actividades de agua. Así han hecho modificaciones en la tolerancia de las levaduras a elevadas presiones osmóticas en masas de panificación que, generalmente, fermentaban con productos químicos a elevada actividad de maltosa y a alta actividad de leudado. Las primeras experiencias obtenidas fueron descritas por Solingen y van der Plaat (1977).

Las cepas de cervecería clasificadas a nivel industrial son generalmente poliploides o aneuploides, esporulan poco y las esporas son poco viables debido a su alta poliploidía y bajo nivel de recombinación, pero estas cepas son genéticamente más estables y menos susceptibles a mutaciones.

Las levaduras están desprovistas de clorofila, por lo que no pueden producir compuestos orgánicos necesarios para su desarrollo a partir de sustancias minerales, actuando entonces como saprofitos o parásitos. Para poder crecer necesitan oxígeno, fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico, diversos minerales y una temperatura y pH adecuados; algunas además necesitan de una o varias vitaminas (tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico, etc.) y otros factores de crecimiento (Bilinski *et al.*, 1986; Reed y Nagodawithana, 1991).

Las levaduras utilizan numerosos sustratos carbonados, bien sea por vía oxidativa única (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*), o bien como la mayoría por vía fermentativa, después de una fase inicial de crecimiento aeróbico (Bourgeois y Larpent, 1994).

Las levaduras no dan lugar a intoxicaciones alimentarias y únicamente *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* son patógenas. Aunque no originan problemas sanitarios en los alimentos, si ocasionan alteraciones en algunos de ellos (Bourgeois y Larpent, 1994).

Al igual que se utilizan microorganismos para la producción de biomasa y metabolitos, las levaduras se emplean para catalizar la conversión de un producto en otra estructura similar de mayor valor comercial, por medio de reacciones de oxidación, hidroxilación, deshidratación, condensación, descarboxilación (Trevan *et al.*, 1990). Algunos procesos por necesitar grandes

cantidades de biomasa para catalizar utilizan levaduras inmovilizadas en soportes inertes, de las mismas células u otros compuestos para que puedan ser reutilizadas.

## 2.2. Criterios para su clasificación.

Las levaduras son tradicionalmente caracterizadas, clasificadas e identificadas según criterios morfológicos. Pero según varios estudios, las características fisiológicas no son siempre genéticamente estables y reproducibles (Scheda, 1966; Scheda y Yarro, 1966). El análisis de levaduras con rutas metabólicas más complicadas sirve de parámetro o patrón para la preparación de tests de asimilación de compuestos de carbono y nitrógeno y clasificación de levaduras (Phaff *et al.*, 1984).

Considerando que son microorganismos unicelulares, su reproducción mayoritariamente es por gemación o reproducción vegetativa. También hay especies que tienen reproducción sexual por esporas que es la base de la distinción de géneros (Kreger-Van Rij, 1984). La reproducción corresponde a una fase de su ciclo biológico, constituida por una alternancia de fases haploide y diploide, en la que las esporas de origen sexual presentan una morfología diferente (forma, aspecto, tamaño), pudiendo servir para la identificación de especies.

En base a su aptitud para formar o no esporas de origen sexual se clasifican en Ascomicetos (levaduras ascospóroenas) y Deuteromicetos (levaduras esporóenas) (Bourgeois y Larpent, 1994). Las levaduras que forman esporas por algún modo de reproducción sexual pueden clasificarse de acuerdo con los estados anamórficos que presenten y se los relaciona con Ascomicetos, Basidiomiceto y Teleomórficos (formas perfectas).

Existen numerosos sistemas de identificación de levaduras que van de una simple observación o pruebas sencillas a técnicas bioquímicas más sofisticadas, como el análisis del sistema de coenzima Q, la composición en bases del DNA, serología o la capacidad de fermentar compuestos de carbono (Lodeer, 1970). Pero la interpretación de datos fisiológicos de fermentación en algunos casos es complicada porque algunas de las fuentes de carbono usadas en tests de crecimiento pueden ser metabolizadas por vías comunes (Barnett, 1976; Golubev, 1989), y más aún cuando el metabolismo de algunos mono, di o trisacáridos es controlado sólo por uno o pocos genes (Winge y Roberts, 1949; Barnett, 1968). Actualmente, se identifican algunas cepas de levaduras en base a 18 compuestos de carbono (Kreger Van Rij, 1984) o a 16 compuestos (Barnett *et al.*, 1990), es decir, se basan en el análisis de las reacciones de asimilación y fermentación de las levaduras.

Kreger Van Rij (1984) ha propuesto un sistema de identificación para la mayoría de especies, utilizando varios criterios:

- **Criterios morfológicos:** se basan en el examen detallado de la forma de reproducción

vegetativa, de la morfología celular y de la formación de pseudomicelio o de micelio.

- **Criterios bioquímicos:** basados en:
  - ◆ Aptitud para fermentar glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa.
  - ◆ Crecimiento en 18 sustratos carbonados.
    - pentosas: D-xilosa, L- arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa;
    - hexosas: D-galactosa;
    - disacáridos: sacarosa, maltosa, celobiosa, trealosa, lactosa;
    - trisacáridos: rafinosa;
    - polisacáridos: almidón;
    - alcoholes: eritritol, ribitol, D-manitol, inositol;
    - ácidos orgánicos: ácido succínico, ácido cítrico;
  - ◆ Asimilación de nitratos
  - ◆ Crecimiento a 37 °C
  - ◆ Crecimiento en medio sin vitaminas
  - ◆ Producción de almidón.

La comparación de los resultados de los distintos tests con la descripción de las especies conocidas se pueden hacer con las tablas y claves descritas en Barnett *et al.* (1990), que sirven para su clasificación.

## **2.3. Factores intrínsecos necesarios para el crecimiento de levaduras.**

### **2.3.1. Actividad de agua.**

El contenido de agua del medio donde se desarrollan las levaduras es un factor importante para su crecimiento, por tanto, el contenido total de agua del sustrato nos da una medida del agua disponible para los microorganismos. Una proporción importante de moléculas de agua pueden estar energicamente adheridas a los componentes del sustrato o a otras moléculas de agua y esta fuerza de atracción es la que sirve para determinar la disponibilidad de agua para el crecimiento de microorganismos.

Las levaduras obtienen casi todos los nutrientes disueltos en el agua que las rodea, por lo que el agua es un elemento indispensable para su crecimiento.

La actividad de agua ( $a_w$ ) es el parámetro que normalmente se utiliza como una medida de la cantidad de agua disponible en el sustrato para el crecimiento microbiano.

Cuando un microorganismo se somete a condiciones de bajas  $a_w$  (presión osmótica alta) el efecto inmediato es la pérdida de agua por ósmosis, con el consecuente encogimiento y plasmólisis de la célula. Para evitar esta plasmólisis reducen el potencial de agua interna mediante la acumulación de solutos intracitoplasmáticos, consiguiendo un equilibrio osmótico entre su medio interior y el ambiente exterior restrictivo y queda el agua retenida. Mediante este sistema se consigue superar los periodos de desecación (Brown, 1978).

El efecto inhibitorio ha sido tradicionalmente descrito como un aumento de la presión osmótica ejercida por solutos de bajo peso molecular (Reed y Nagodawithana, 1991).

A presiones osmóticas elevadas producidas por altas concentraciones de sales en el medio que rodea a la célula, el agua intracelular sale hacia la zona de mayor concentración de sales y se puede producir una plasmólisis. En estas condiciones el crecimiento de la célula sería inhibido.

La capacidad de retención de agua que tienen los componentes de los alimentos disminuye en el siguiente orden: componentes iónicos > azúcar, polihidroalcoholes, aminoácidos y otros compuestos de bajo peso molecular > compuestos de alto peso molecular (Mossel e Ingrand, 1955).

La respuesta de los microorganismos y adaptación a la  $a_w$  varía según su posición taxonómica, las levaduras y hongos filamentosos pueden soportar y crecer en un medio de crecimiento que contenga altas concentraciones de azúcares (Hocking, 1993), generalmente crecen a  $a_w$  entre 0,87 y 0,98 (Mossel y Moreno, 1982).

Existen especies de levaduras denominadas osmofílicas que son capaces de desarrollarse en una  $a_w$  menor a 0,85 (Pitt, 1975), soportando más las altas concentraciones de azúcares que de sales. Otras especies, que se denominan osmotolerantes resisten  $a_w$  del orden de 0.65 (*Zigosaccharomyces rouxii* y *Torulopsis candida*), valor al que ningún otro microorganismo puede desarrollarse.

Generalmente cuando las levaduras crecen a  $a_w$  bajas se reduce su tolerancia a otros factores limitantes. Los rangos de pH en los cuales pueden crecer son menores, la temperatura mínima a la que crece puede aumentar (Mossel y Moreno, 1982) y la velocidad de crecimiento disminuye. Por ejemplo, un tiempo de generación de 1,3 horas a  $a_w$  de 0,98 pasa a 2,15 horas para una  $a_w$  de 0,935 (Tilbury, 1980), alargándose la fase de latencia (Mossel y Moreno, 1982).

La habilidad de las levaduras para superar las condiciones limitantes de  $a_w$  y presentar altos niveles de osmotolerancia no está bien clara pero se considera que depende de tres factores:

1. La capacidad de sintetizar o acumular altos niveles de glicerol citoplasmático que rápidamente

se equilibra con la alta presión osmótica que le rodea (André *et al.*, 1988);

2. Los altos niveles de trealosa como fuente de carbono y que probablemente mantienen la integridad de la membrana, para evitar que salgan los solutos en función de la solubilidad de los mismos;
3. La baja actividad invertasa para mantener baja la presión osmótica, especialmente en los sistemas donde la sacarosa es usada como fuente de azúcar (Reed y Nagodawithana, 1991).

Según últimos estudios, se ha determinado que polihidroalcoholes de bajo y alto peso molecular (polioles), como el glicerol, eritrol, arabitol y manitol, son acumulados en las células fúngicas en condiciones de baja disponibilidad de agua (Hocking, 1986; Ellis y Pfeiffer, 1991; Van Eck *et al.*, 1993).

Las levaduras osmófilas se caracterizan por aumentar su temperatura óptima de crecimiento con el aumento de las concentraciones de azúcares y la consecuente reducción de la  $a_w$ , pudiendo crecer hasta 5 °C. Son anaerobios facultativos, utilizan preferentemente la fructosa como fuente de carbono y pueden pertenecer al grupo de los basidiomicetos.

Spencer y Sallans (1956) mantuvieron 79 cepas de levaduras osmofílicas con producción de polirol y encontraron que aproximadamente la mitad de ellas a la vez que crecían más rápido, producían mayoritariamente glicerol y D-arabitol, y sólo las que crecían lentamente producían mayoritariamente glicerol y eritrol.

Anand y Brown (1968) encontraron que las levaduras no-xerofílicas tienen más ampliamente definida la  $a_w$  óptima para su crecimiento que las xerofílicas que son afectadas por algunos solutos reguladores de la  $a_w$ . Los dos tipos de levaduras son menos tolerantes a bajas  $a_w$  en presencia de polietilenglicol que en presencia de azúcares. La sacarosa, glucosa y sorbitol se acumulan cuando están presentes en el medio de crecimiento, observándose también que la prolina y otros aminoácidos pueden tener un papel importante en este mecanismo de tolerancia.

Nickerson y Carroll (1945) encontraron que en un medio con un 20 % en peso de azúcares fermentables, la *Zygosaccharomyces acidifaciens* producía una sustancia que se identificó como glicerol.

La levadura *S. cerevisiae*, al ser producida en un medio de melaza de caña de azúcar en alta concentración (22 %) a 33 °C, mejora su resistencia a elevadas concentraciones de etanol que es un factor limitante, debido a la producción y acumulación en su estructura celular de elevadas reservas de glucógeno y trealosa (Morimura *et al.*, 1997).

En el caso de las levaduras para panificación, su crecimiento y actividad fermentativa es inhibida por el incremento de la presión osmótica ejercida por fuentes como cloruro de sodio o azúcares

presentes en el caldo de crecimiento o en las masas dulces, requiriéndose altas concentraciones de las mismas y más tiempo de fermentación.

En levaduras para vinificación, el vino es la primera fuente para aumentar la presión osmótica, debido a su alta concentración de azúcares especialmente fructosa y glucosa (Reed y Nagodawithana, 1991).

### **2.3.2. Acidez y capacidad tampón.**

Las levaduras durante el proceso de crecimiento y fermentación metabolizan los componentes del medio de crecimiento. Descomponen los azúcares, desaminan y decarboxilan los aminoácidos, proteínas y otros componentes de los caldos de crecimiento como: extractos de maíz, malta, melaza, bagazo, levadura de cerveza. Alteran considerablemente el pH del medio a la alcalinidad, pudiéndose producir efectos represivos de los metabolitos generados en el medio sobre el producto (Ward, 1989; Reed y Nagodawithana, 1991).

Si se mantiene constante el pH del medio de crecimiento, los porcentajes de síntesis de proteínas son altos y se mantiene la actividad mitocondrial de las levaduras (Bridson y Brecker, 1987).

La asimilación de nitratos, sulfatos y cloruros, presentes como sales en el medio de crecimiento, puede dar lugar a la acidez del medio, aunque si se añade en forma de nitrato de amonio éste se asimila preferentemente en forma de ion amonio (Ward, 1989).

La asimilación de la fuente de nitrógeno también puede dar lugar a la alcalinidad del medio de crecimiento, como en el caso de la utilización de urea.

Fuentes orgánicas de nitrógeno como: proteínas hidrolizadas, extracto de maíz, los productos solubles de destilería como bagazos, gérmenes y extractos de cerveza, pueden modificar el pH y llevarlo a la alcalinidad. Según la modificación del pH se pueden dar efectos represivos de los constituyentes del medio sobre el crecimiento o producción de la levadura (Ward, 1989).

#### **2.3.2.1. Control del pH con soluciones tamponantes.**

Para atenuar la acidez del medio causada por la disminución brusca del pH durante el crecimiento de los microorganismos se utilizan los compuestos tamponantes como el fosfato, que es el más común por ser un nutriente esencial para su desarrollo.

Generalmente se añade en exceso para pH comprendidos entre 6 y 7 (Ward, 1989), pero puede secuestrar alcanos y metales del medio y formar complejos insolubles; los glicerofosfatos no presentan este problema (Bridson y Brecker, 1987). También se recomienda el uso de bicarbonatos más que de dióxido de carbono.

Otros tamponantes utilizados son: el carbonato de calcio o hidroxisales, amonio líquido o gaseoso,

ftalato hidrógeno de potasio, ácido cítrico con fosfato hidrógeno de sodio, tartrato hidrógeno de potasio y para pH básicos ácido sulfúrico y ácido clorhídrico (Ward, 1989). Los ácidos orgánicos se utilizan como agentes tamponantes para valores de pH ácidos.

Las características a tener en cuenta para que una solución tamponante sea utilizada son:

1. Mantenimiento del pH;
2. Control de los efectos biológicos del sistema (Bridson y Brecker, 1987);
3. Favorecer la producción de altos porcentajes de síntesis de proteínas y mantenimiento de la actividad mitocondrial de los microorganismos (Bridson y Brecker, 1987).

El pH del medio se puede controlar indirectamente por medio de un balance equitativo entre las fuentes de carbohidratos y nitrógeno. Los carbohidratos contribuyen a reducir el pH por la formación de ácidos orgánicos y las sales de amonio, como sulfatos y cloruros, producen además condiciones ácidas debido a la liberación de los ácidos, o básicas durante la asimilación del ion amonio liberado por la urea (Ward, 1989).

### 2.3.3. pH.

El pH del protoplasma de las células de levaduras está alrededor de 5,8 pero no tienen igual pH en sus diferentes partes, encontrándose entre un rango de 5,1 a 6,3, característica que les permite mantener valores constantes de pH interno en soluciones con un rango de pH de 3 a 7.

El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras varía según la especie, estando alrededor de 4,5 a 6,5, aunque muchas especies toleran grandes variaciones de pH de 2,8-3 a 8-8,5.

En levaduras de panificación como *S. cerevisiae* la mayor fermentación y producción se obtiene en pH entre 4 y 6, a pH menores de 4 no pueden ser utilizadas y a pH muy alcalinos el decrecimiento es mayor (Franz, 1961; Garver *et al.*, 1966). En cambio, las levaduras de vino de la misma especie fermentan el jugo de la uva a pH 3,2 aunque algunas fermentan más lentamente a pH de 3,8. Las levaduras del vino pueden fermentar masas de pan a niveles de pH de 4,5 a 5 con un porcentaje de fermentación solo del 20 % más bajo que las cepas de panificación (Reed y Nagodawithana, 1991).

El pH óptimo para el crecimiento de levaduras también varía en función del medio de crecimiento, así el pH del mosto de uva para fermentar presenta valores entre 3,1 y 3,9, dándose una mejor fermentación a altos valores de pH, con un mayor y más rápido crecimiento (Ough, 1966).

Los pH extremos dificultan el crecimiento de las levaduras, es decir, tanto un pH muy ácido de 2 como alcalino de 9 reducen casi por completo su crecimiento. La inhibición en el crecimiento en medios ácidos depende también del tipo de ácido utilizado. Una levadura puede crecer a pH muy

bajos si las condiciones intrínsecas y extrínsecas del medio de crecimiento son óptimas para la misma (Chung, 1970). Además, influye la capacidad tamponante del medio de crecimiento (Mossel y Moreno, 1982).

Bajos niveles de pH minimizan el crecimiento de contaminantes bacterianos, pero incrementa la absorción de material coloreado de las melazas, inconveniente a nivel industrial (Reed y Nagodawithana, 1991).

El efecto del pH sobre el medio de crecimiento de melazas de remolacha azucarera determina la mayor producción de etanol o crecimiento del *Clostridium thermohydrosulfuricum* DSM, ya que el intervalo de pH de 7 a 8 es óptimo para la producción de etanol y a partir de un pH de 4,5 tiene mejor crecimiento (Dönmez y Özçelik, 1992).

A nivel industrial, la fermentación generalmente se inicia en pH entre 4 y 5 y finaliza en valores de pH cercanos a 6 (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### **2.3.4. Potencial redox y capacidad de equilibrio.**

La clasificación de los microorganismos como aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios, se basa en el potencial redox (Eh) necesario para su metabolismo y multiplicación (Hewitt, 1950).

Es un índice de su grado de oxidación, es decir de la tendencia intrínseca a oxidarse y de la concentración de sustancias oxidantes, reductoras y del pH del medio o composición química del mismo.

En conclusión, el potencial redox y la presión del oxígeno influyen en el crecimiento de las levaduras.

Las fermentaciones aerobias son exotérmicas durante las fases de crecimiento y metabolismo activo y exigen refrigeración para poder controlar la temperatura.

Los procesos aerobios que requieren oxígeno como materia prima necesitan 192 g de oxígeno para oxidar 180 g de glucosa, es decir que se necesitan 0,4 g de oxígeno para producir 1 g de peso seco de levadura a partir de glucosa.

Para la producción de biomasa a niveles altos, el oxígeno disuelto debe estar por encima de la concentración crítica, que varía en función de la levadura y del medio de crecimiento (Ward, 1989).

#### **2.3.5. Nutrientes.**

Los requerimientos nutricionales y propiedades específicas de las levaduras varían considerablemente con los sustratos utilizados para su crecimiento o fermentación, las condiciones

ambientales que le rodean y la variedad de cepa (Reed y Nagodawithana, 1991).

### 2.3.5.1. Fuentes de Carbono.

Las levaduras pueden utilizar algunos azúcares simples como la glucosa y fructosa presentes mayoritariamente en las melazas. Los disacáridos, trisacáridos o polisacáridos son asimilados después de ser hidrolizados en el interior o exterior de la células (Bourgeois y Larpent, 1994).

Durante la producción de levaduras no se utilizan simultáneamente todos los azúcares (Oura *et al.*, 1982), el primer azúcar en fermentar es la sacarosa que es hidrolizado por la enzima invertasa, seguidamente la levadura comienza a utilizar rápidamente la glucosa y fructosa generadas.

La glucosa es usada en mayor proporción que la fructosa al inicio del proceso fermentativo (Oura *et al.*, 1982). Cuando la glucosa y fructosa decrecen por debajo de cierto umbral de concentración, el consumo de maltosa se incrementa si ésta se encuentra en el medio, y comienza la utilización de las maltotriosas poco a poco (Hautera y Lovgen, 1975; Spencer y Spencer, 1983).

Los monosacáridos entran en la célula de la levadura por difusión facilitada, en tanto que la sacarosa es rápidamente hidrolizada por invertasas fuera de la membrana celular y los monosacáridos formados son los que entran. La maltosa se introduce en la célula por transporte activo por medio de la maltopermeasa, por lo que este paso de transporte inducido de enzimas es limitante en la fermentación de la maltosa (Robertson y Halvorson, 1957). La melobiosa es incapaz de ser utilizada debido a la falta de la enzima melobiasa (Liljeström - Suominen *et al.*, 1988; Matz, 1988).

Levaduras como *S. cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, tienen la habilidad de fermentar maltotriosas, maltosa, sacarosa, glucosa y fructosa presentes en un mosto regular. Otras levaduras, como las de cervecería, no tienen la capacidad de utilizar las dextrinas, el almidón, las maltotetrosas, polisacáridos de alto peso molecular por lo que se han desarrollado nuevos métodos para convertir estos polisacáridos en azúcares fermentables. Un proceso es el braceado en que las enzimas secretadas por las semillas de la cebada durante el malteado convierten los azúcares en asimilables gracias a las siguientes transformaciones:

- Conversión de almidón en azúcar fermentable por la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas presentes en la malta;
- Conversión de proteínas y polipéptidos en aminoácidos y pequeños péptidos.

Los azúcares fermentables formados durante este proceso son usados por las levaduras para producir etanol, CO<sub>2</sub> y algunos aminoácidos importantes para el crecimiento de las levaduras, y también para contribuir a las características de sabor y habilidad de formar espuma, en el caso de levaduras de cerveza.

En cepas de cervecería se están desarrollando levaduras con capacidad de fermentar dextrinas y almidón del mosto, a través de su hidrólisis por la enzima  $\beta$ -fructosidas (invertasa) y  $\alpha$ -galactosidasa (melibiasa) (Reed y Nagodawithana, 1991). El objetivo es el incrementar su eficiencia, producir levaduras con bajas calorías, y con capacidad de utilizar la rafinosa.

Aproximadamente todas las cepas de *S. cerevisiae* son glucolíticas por la presencia de dos enzimas invertasas, es decir, que fermentan más rápido la glucosa que la fructosa. Otras son fructificas (Sols, 1956), de las cuales algunas especies también son osmotolerantes, siendo trealosa el azúcar más característico presente en su estructura celular (Bertrand *et al.*, 1975).

La presencia de fuentes de carbono en un nivel crítico modifica el metabolismo del crecimiento respiratorio de las células a metabolismo fermentativo (Woehrer y Roehr, 1981). La glucosa es el azúcar más represor, reprime las enzimas que intervienen en el metabolismo de otros azúcares y en la respiración.

La concentración crítica a la cual la glucosa es metabolizada en etanol y dióxido de carbono, a pesar de un exceso de aire, se encuentra en el rango entre 35 a 280 mg/l, con una concentración de glucosa de alrededor 5 %, produciéndose la inhibición de la síntesis de las enzimas respiratorias. Otros autores han encontrado como concentración crítica de glucosa (3,6 - 210 mg/l), variación que depende de las cepas o las condiciones fisiológicas de las células (Woehrer y Roehr, 1981), en las cuales el metabolismo es fermentativo sea cual sea el nivel de aireación. Este fenómeno se conoce como efecto glucosa o *efecto Crabtree* (Bourgeois y Larpent, 1994).

Las levaduras de panificación son sensibles a la concentración de glucosa sobre el 0,2 %, en se produce la excreción de productos intermedios de metabolismo semejantes al etanol; esta represión tiene lugar inclusive con la presencia de oxígeno disuelto. Para evitar alcanza la concentración crítica de glucosa, se debe suministrar el azúcar a bajos porcentajes y en forma constante, los cuales puedan ser tomados por las células continuamente (Reed y Nagodawithana, 1991).

Las células de levadura pueden acumular glucógeno o trealosa como hidratos de carbono de reserva, proporcionando la energía a las células durante las fases de adaptación a un nuevo medio o de esporulación, siendo también importantes en la osmotolerancia.

Durante las fermentaciones, la tolerancia a la producción de etanol y la viabilidad de la célula es influenciada por la presencia de una pequeña cantidad de oxígeno en el medio y se relaciona con la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados que envuelven la membrana (Park *et al.*, 1990).

Los ácidos grasos insaturados son muy importantes en la función mitocondrial de la membrana. *S. cerevisiae* no puede sintetizar esteroides en condiciones anaerobias, por lo que presenta poca actividad metabólica; pero con una nueva técnica en que las levaduras de vino crecen en sistemas continuos en presencia de aire, tienen reservorios de ácidos grasos insaturados y esteroides.

La falta de vitaminas en el medio de crecimiento y fermentación también puede ser responsable de la sensibilidad de las levaduras al alcohol (D'Amore *et al.*, 1989).

### 2.3.5.2. Fuentes de nitrógeno.

No todas las levaduras pueden utilizar fuentes de nitrógeno mineral. *Candida utilis* usa los nitratos y *S. cerevisiae* es incapaz de hacerlo.

Entre las fuentes de nitrógeno mineral, las que presentan mejor asimilación son las sales de amonio; con la urea se obtienen iguales resultados de crecimiento que con las sales de amonio. Entre las fuentes de nitrógeno orgánico los ácidos glutámico y aspártico y sus aminas son las mejores. El crecimiento de las levaduras es mayor en presencia de aminoácidos o sales de amonio que con péptidos.

El ácido glutámico, ácido aspártico y asparagina en formas L y D son efectivas fuentes de nitrógeno (Reed y Nagodawithana, 1991). Últimas investigaciones proponen la hipótesis que los aminoácidos son asimilados intactos por las levaduras e incorporados en las proteínas celulares, fenómeno que solo sucede cuando la célula es obligada a sintetizar un aminoácido particular debido a su deficiencias en el medio de crecimiento.

Las levaduras de cervecería pueden asimilar péptidos de bajo peso molecular. Hudson (1960) indicó que en un medio de fermentación de levaduras de cerveza se consume sobre el 45 % del nitrógeno total.

Entre los medios con suficiente contenido de nitrógeno como materia prima están: malta, arroz, derivados del maíz, extracto de levadura de cerveza, germen de cebada, que proveen los mejores niveles de compuestos alfa amino nitrogenados, también los zumos de uvas.

En los zumos de manzanas, cerezas y de otras frutas la concentración de nitrógeno asimilable es más baja (Reed y Nagodawithana, 1991).

Caillièret-Ethuin *et al.* (1998) demostraron que el crecimiento de *Tetrahymena rostrata* en medio de extrato de levadura de cerveza al ser enriquecida con lactosuero, leche desnatada, polvo de pescado y suero de mantequilla como fuentes de nitrógeno, se incrementaba notoriamente.

La melaza de remolacha azucarera y de caña de azúcar contienen poca concentración de materiales nitrogenados y una pequeña porción de los aminoácidos presentes son asimilables (Kautzmann, 1969). La betaína de la remolacha azucarera no es asimilable.

En las fermentaciones de vinos y cervezas la concentración de compuestos amino nitrogenados, por ser fundamentales, se debe suministrar al medio como sales de amonio: sulfatos, fosfatos o urea.

El suministro de nitrógeno en forma de sulfato o fosfato de amonio conduce a la liberación de ácido sulfúrico o fosfórico que deben ser metabolizados para no alterar el pH del medio.

La urea se puede emplear como fuente de nitrógeno pero requiere altos niveles de biotina y es más propensa a descomponerse a elevadas temperaturas de esterilización térmica (Large, 1986).

El nitrógeno de los compuestos nitrogenados se disocia en forma de iones amonio e hidrógenos que dan valores de pH alcalinos al medio de crecimiento, como sucede cuando utilizan las glutaminas, alanina, glutamato, valina, leucina, carbonil fosfato y urea que se asimilan en forma de iones amonio por esta vía (Brown, 1974).

Muchos hongos filamentosos y algunas levaduras utilizan nitrato como fuente de nitrógeno, cuya asimilación se produce por la reducción a amonio, a cargo de la amonio reductasa (Campbell, 1970).

Los aminoácidos purificados se utilizan en fermentaciones especiales y sustratos complejos como tejidos de plantas y subproductos animales, vegetales y microbianos; contienen un alto porcentaje de fuentes de nitrógeno (Ward, 1989).

*Saccharomyces* asimila compuestos nitrogenados y aminoácidos y puede también asimilar péptidos y proteínas cuando éstos son hidrolizados a aminoácidos como la arginina, ácido glutámico, prolina y treonina predominantemente (Lafon-Lafourcade, 1983).

Durante la fermentación, la concentración de aminoácidos en el mosto decrece y aún más cuando la temperatura o la concentración de etanol aumenta. Cuando se suspende el crecimiento de las levaduras, los remanentes de los aminoácidos permanecen estables y se incrementan ligeramente debido a la lenta autólisis de las células (Ingledeew y Kunkee, 1985).

Mangiot *et al.* (1997) determinó la influencia del suministro de fuentes de nitrógeno en la mejora de la producción de etanol por parte de *S. cerevisiae*, estableciendo que el suministrar sales de amonio y aminoácidos como serina, treonina y glicina en el inicio de la fermentación mejoran su producción.

### 2.3.5.3. Vitaminas.

Las levaduras necesitan una gran variedad de vitaminas para su crecimiento y metabolismo. Pero existe una gran diferencia entre las vitaminas necesarias para actividades respiratorias y para el crecimiento. *Hansenula anomala* puede crecer normalmente sin complementos vitamínicos, pero en cambio, otras especies necesitan vitaminas para su crecimiento, que sirven como coenzimas y se utilizan en el metabolismo y en funciones catalíticas.

Todas las vitaminas con excepción del mesoinositol son necesarias para funciones catalíticas y de metabolismo celular de las levaduras. La biotina es la vitamina más requerida, porque participa en

todas las reacciones de carboxilación que implica la síntesis de otras proteínas, ácidos nucleicos, metabolismo de carbohidratos y síntesis de ácidos grasos. Su deficiencia se demuestra claramente por el poco crecimiento y daños en la membrana plasmática.

Algunas levaduras como las de cervecería pueden sintetizar bajas concentraciones de tiamina, riboflavina y niacinamida que son los componentes de las coenzimas que participan en muchos procesos fermentativos de óxido-reducción, pero no influyen mucho en el crecimiento celular (Ingledey y Kunkee, 1985).

Existen pocas especies de levaduras capaces de sintetizar por sí mismas sus requerimientos de inositol, que tiene funciones estructurales como componente de fosfolípidos en la síntesis de membranas (Reed y Nagodawithana, 1991).

El ácido nicotínico no es una vitamina indispensable para el crecimiento cuando las levaduras se propagan bajo altas condiciones de aerobiosis, pero no puede ser sintetizado bajo condiciones anaeróbicas. Un fenómeno similar se ha descubierto con la riboflavina.

Los medios de crecimiento son generalmente una rica fuente de vitaminas y otros factores de crecimiento. Generalmente, contienen biotina, tiamina, pantotenato de calcio, ácido nicotínico, riboflavina, inositol, piridoxina, piridoxal y piridoxamina.

Las levaduras de panificación requieren de biotina para su crecimiento. La melaza de caña de azúcar y de remolacha azucarera suministran alta cantidad de esta vitamina, y además contienen suficiente cantidad de pantotenato, inositol, tiamina, piridoxina y ácido nicotínico.

Otros medios de fermentación como jarabe de dátiles y de maíz tienen muy escasa cantidad de biotina y deficiente contenido de vitaminas, que se deben adicionar como compuestos sintéticos en un rango de 60 - 110 mg/100 g de levadura que se quiera producir (Reed y Nagodawithana, 1991).

El medio de mosto de uva contiene menos vitaminas que los medios de melaza de caña de azúcar y de remolacha azucarera que limitan la multiplicación de las levaduras durante la fermentación.

También tiene deficiencias en los factores de crecimiento que determinan un desarrollo de levaduras débiles y posiblemente alteraciones en la fermentación. La falta de estos nutrientes puede influir en la sensibilidad de las levaduras al alcohol (Ingledey y Kunkee, 1985; D'Amore *et al.*, 1988).

Vitaminas como ácido pantoténico, tiamina, biotina e inositol son necesarias para el óptimo metabolismo de las levaduras durante su reproducción (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### **2.3.5.4. Fuentes de minerales.**

Los medios de cultivo utilizados generalmente, contienen suficiente cantidad de minerales para

facilitar el crecimiento de las levaduras, especialmente fosfatos y sales de sulfato.

Son seis los minerales esenciales para las levaduras, en orden de importancia tenemos: fósforo, magnesio, potasio, sodio, manganeso y compuestos sulfurados. También trazas de ciertos elementos son esenciales para el metabolismo de las levaduras, entre los cuales se encuentra el cobre, hierro, cinc, manganeso, níquel y cromo.

Los minerales son parte integral de las proteínas como activadores enzimáticos y funcionan como cofactores en reacciones químicas que se dan en las células y también se requieren para su crecimiento (Reed y Nagodawithana, 1991).

El magnesio es esencial para el crecimiento, porque actúa como activador enzimático en numerosas reacciones bioquímicas.

Las levaduras también sintetizan trealosa como respuesta a un choque osmótico (Brown, 1978). Algunas levaduras se hacen más exigentes en nutrientes cuando crecen a temperaturas más altas o valores de  $a_w$  más bajos.

Las melazas contienen suficientes minerales como potasio, calcio, azufre y magnesio. Se deben adicionar al medio de cultivo fósforo para mejorar el crecimiento, y se puede suplementar en forma de ácido fosfórico o en sus sales como el fosfato de amonio (Oura *et al.*, 1974).

## **2.4. Factores extrínsecos para el crecimiento de levaduras.**

Los factores extrínsecos son propios del ambiente, entre los que se incluyen la temperatura, humedad y la tensión de oxígeno. Estos parámetros pueden influir sobre el crecimiento de las levaduras en respuesta a cambios del ambiente que las rodea. Modifican su estructura y mecanismos de funcionamiento para poder sobrevivir en las nuevas condiciones.

En principio, los cambios se pueden producir en dos vías: cambios en la constitución genética o cambios en su fenotipo. La levadura que presente capacidad de metabolizar y acumular nutrientes tiene más ventaja de competitividad.

### **2.4.1. Temperatura.**

La temperatura de crecimiento de las levaduras está comprendida entre 5 °C y 30 - 37 °C y varía según la especie. Aproximadamente, el valor óptimo se sitúa hacia los 25 °C. En algunos casos, la multiplicación vegetativa tiene lugar incluso cerca de los 0 °C o algo por debajo, pero el crecimiento es muy lento.

En el crecimiento las levaduras necesitan temperaturas más altas que durante las fermentaciones anaerobias de masa de pan, mosto de uvas o caldos de cerveza. A bajas temperaturas se da un menor crecimiento (Bisson *et al.*, 1980).

White (1954) expresó los tiempos generacionales en función de la temperatura: 20 °C, 5 h; 24,5 °C, 3 h; 30 °C, 2,2 h, etc. Estos valores no pueden ser trasladados y utilizados literalmente en la práctica porque existen muchos otros parámetros que influyen en los tiempos generacionales como son: el medio de crecimiento, aireación, pH, etc. Algunas levaduras pertenecientes al grupo de los basidiomicetos y levuriformes pueden desarrollarse a 5 °C y temperaturas más inferiores.

El porcentaje de fermentación aumenta con el incremento de temperatura. La temperatura óptima para fermentar varía entre 15 y 22 °C en el vino blanco y de 25 a 30 °C en vino rojo. La temperatura de fermentación también afecta la producción de etanol y a altas temperaturas disminuye su producción, debido a la pérdida de etanol en el escape del CO<sub>2</sub>. Influye también en el aroma (Bisson *et al.*, 1980).

La fermentación anaerobia por lo general es una reacción exotérmica y en algunas especies se incrementa la temperatura. Barillère *et al.* (1983) indican que en cepas de *S. cerevisiae* a temperaturas entre 48 y 53 °C disminuye considerablemente la fermentación y a temperaturas más elevadas se puede incluso matar a la levadura, incrementándose su sensibilidad con la presencia de altas concentraciones de etanol.

Existen muchas levaduras termotolerantes que son capaces de fermentar a temperaturas sobre los 40 °C. D'Amore *et al.* (1989) aislaron una cepa de *Saccharomyces* con capacidad de fermentar a 45 °C y producir etanol. Banat *et al.* (1992) reportaron el aislamiento de diferentes levaduras termotolerantes del género de *Kluyveromyces*, capaces de crecer sobre los 52 °C y producir etanol sobre los 50 °C. *Kluyveromyces marxianus* es capaz de crecer a 49 °C y producir etanol a 40 °C (Banat y Marchant, 1995).

Las levaduras de panificación mejoran su crecimiento con el aumento de temperatura. Se incrementa en un 25 % el crecimiento al cambiar la temperatura de 29 °C a 33,5 °C, pero al superar los 38 °C comienza a darse el efecto destructivo de la célula (Bisson *et al.*, 1980).

Las levaduras que toleran bajas temperaturas no se multiplican celularmente, sino que sobreviven, con excepción de levaduras que tienen como temperatura mínima de crecimiento de 0 a 5 °C, rango en que son capaces de modificar la fluidez de la membrana en función de la temperatura del ambiente que les rodea. Algunas levaduras pueden mantener lipólisis por debajo de los 0 °C como *Sacharomycopsis lipolitica*, pero a esta temperatura muchas especies no pueden fermentar ni asimilar nitratos (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### **2.4.2. Tensión superficial de oxígeno.**

La aireación de un cultivo presenta la ventaja de aportación del oxígeno necesario para la respiración y de eliminación del CO<sub>2</sub> producido por el metabolismo de los sustratos carbonatados.

Bajo condiciones anaerobias la producción de biomasa de levaduras basada en el peso de azúcar fermentado es bajo y el coeficiente de producción ( $Y_s$ ) es generalmente de 0,075 (7,5 kg de levadura sólida por 100 kg de glucosa). En cambio bajo estrictas condiciones de aerobiosis la producción es alta y el coeficiente de producción ( $Y_s$ ) es de 0,54 (Reed y Nagodawithana, 1991).

A nivel industrial, el objetivo de una planta de producción de levaduras es maximizar su crecimiento y minimizar la fermentación alcohólica, para lo cual el medio de fermentación debe tener una cantidad límite de carbohidratos para que el nivel de azúcares fermentables no supere la concentración a la que se produce la represión catabólica.

El suministro de oxígeno por aireación debe ser suficiente para que no se forme etanol durante el proceso fermentativo y es conveniente mantener un coeficiente de crecimiento bajo, así pues el aire suministrado debe ser rico en oxígeno. Según resultados experimentales, se requiere 1 g de oxígeno para la formación de 1 g de masa de levadura (Mateles, 1971).

Es difícil establecer un adecuado sistema de aireación, varía con la configuración del fermentador, velocidad del flujo de aire, velocidad de agitación, propiedades fisico-químicas y reológicas del medio de cultivo como la viscosidad y tensión de interfase (gas/líquido), grado de burbujeo, y presencia de agentes antiespumantes (Reed y Nagodawithana, 1991). Entre los sistemas más utilizados está el de oxidación por sulfito (Linek y Benes, 1978).

La fuerza de conducción de oxígeno del gas al líquido puede ser incrementada por el aumento de la presión de gas. Se utiliza en las fermentaciones comerciales, que varía en función del incremento del peso del líquido del fermentador (Reed y Nagodawithana, 1991).

Wang *et al.* (1977) mostró que la composición nutritiva elemental para el crecimiento de las levaduras es: C = 45 %, H = 6,8 %, N = 9 %, O = 30,6 %, porcentajes calculados en base a la fórmula molecular reportada por Harrison (1967) que es  $C_6H_{10}NO_3$ , donde una parte del oxígeno requerido es incorporado en la masa celular y la otra parte se libera como  $CO_2$ .

Durante el crecimiento y metabolismo, tiene lugar en forma continua la transferencia de nutrientes y metabolitos sólidos, líquidos y gaseosos entre el medio ambiente externo y la célula. La velocidad de transferencia de masa entre las fases líquidas y gaseosas está influenciada por la solubilidad del gas en la fase líquida.

En el inicio de la gemación hay un agudo incremento en la respiración, por lo que aumenta el consumo de oxígeno y aumenta la producción de  $CO_2$ , que coincide con cortos períodos de formación de etanol (Meyenburg, 1969).

La transferencia de oxígeno a partir de las burbujas de aire a la solución es la etapa limitante de la velocidad de las fermentaciones en medios no viscosos y más limitante en fermentaciones en

cultivos viscosos (Ward, 1989).

El oxígeno es un componente nutricional esencial de las fermentaciones aerobias, en oposición a otros nutrientes es muy difícil de suministrar por su baja solubilidad en el agua, siendo un factor determinante de la velocidad metabólica. En la práctica, el porcentaje de oxígeno transferido en un sistema de fermentación o en un medio de crecimiento es expresado en mmoles de oxígeno transferidos por litro por hora, y en función de resultados experimentales: 2 g de oxígeno producen 1 g de levadura sólida.

A una atmósfera de presión y 30 °C, la solubilidad del oxígeno en el agua es de 1,16 mmol/dm<sup>3</sup>. La concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación será el balance entre el suministro de oxígeno disuelto y la demanda por parte de los organismos. Cuando la concentración de oxígeno disuelto se encuentra bajo el nivel crítico, usualmente inferior a 0,05 mmol/dm<sup>3</sup>, es debido a una baja aireación.

La concentración de oxígeno es elevada en los medios de melazas, pero tras 11 horas de fermentación se reduce, siendo necesario oxigenar con el objetivo de no llegar a una concentración crítica que limite el crecimiento de las levaduras (Finn, 1967).

Para una óptima producción, los niveles de oxígeno deben estar entre 28 y 34 % de gas atomizado, que corresponde a un 55 % de producción de sustrato (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### **2.4.3. Los antiespumantes como reductores de la tensión superficial.**

La espuma producida por la desnaturalización de las proteínas reduce la superficie de contacto del oxígeno con la levadura, disminuyendo el crecimiento de las mismas. Esto puede ser un problema en los fermentadores, ya que cuando se produce en exceso puede evacuar parte del contenido del fermentador a través de la salida de aire y causar la eliminación de las células del medio.

Los antiespumantes son tensoactivos que reducen la tensión superficial de la espuma y las dispersan. Su eficacia varía en función de las condiciones de la fermentación, composición del medio, cepa, etapa de crecimiento y configuración de la vía de aireación del fermentador (Finn, 1967).

Los antiespumantes por su baja solubilidad necesitan de un soporte, como aceite orgánico o mineral, y su cantidad debe ser mínima, dado que puede afectar la velocidad de transferencia de oxígeno hasta en un 50 %.

Los antiespumantes no deben ser tóxicos, ni peligrosos, esterilizables por el calor y baratos (Reed, 1983). Pueden ser siliconas y derivados de ácidos grasos.

## 2.5. Género *Candida*.

### 2.5.1. Características generales.

El género *Candida* comprende aproximadamente 200 especies que son la reunión de asporógenos anamórficos e imperfectas levaduras.

Después de la unión de los géneros *Torulopsis* con *Candida*, este nuevo grupo contiene más de la tercera parte de las especies de levaduras (Meyer *et al.*, 1984). Comprende las especies de levaduras que no han sido asignadas en otro género imperfecto.

Son predominantemente ascomicetos y 25 especies de levaduras que son basidiomicetos presentes en la naturaleza. *Candida* incluye especies con y sin hifas, especialmente debido a la combinación del género *Torulopsis*, el cual es carente de pseudomicelio (Yarrow y Meyer, 1978).

Estudios sobre la composición de la pared celular y todas las etapas de la hidrólisis de la célula de un variado número de especies de *Candida* ha servido de base para poder organizar y resolver la heterogeneidad de este amplio y distendido género (Deák, 1991).

El género *Candida* debe ser asignado sólo para las formas anamorfas que muestran los ascomicetos afines, pared celular compuesta mayoritariamente por manano y glucano y que contiene o no muy poca quitina, eliminándose las que presentan en su pared celular alta o moderada cantidad de quitina.

En base a los monosacáridos encontrados en las células hidrolizadas, se puede clasificar el género *Candida* en tres grupos: el primero que contiene xilosa en adición con glucosa y manosa, otro grupo que contiene fructosa, ramnosa y/o galactosa pero no tiene xilosa, y un tercer grupo que muestra afinidad por *smuts* (Deák, 1991).

Muchas especies causan enfermedades en los humanos como la candidiasis originada por *Candida albicans* Otras son contaminantes como *Candida krusei* que es importante en la industria del pan porque es un contaminante de gran capacidad de propagación, y a menudo se la denomina como *Monilia blanca* (Meyer *et al.*, 1984).

Algunas especies de *Candida* crecen aeróbicamente en D-xilosa o celobiosa presentando un buen crecimiento en glucosa, sacarosa y maltosa. *Candida utilis* es especialmente versátil en la asimilación de azúcares característicos y es una de las levaduras propagadas comercialmente en una variedad de sustrato incluido en el medio denominado "azúcar de madera" para usos de alimentación.

Otras especies del género *Candida* crecen bien en fracciones de petróleo (Bell, 1971), normalmente alcanos y alquenos que son sustratos asimilables de *C. utilis*, *C. tropicalis* y

*C. lipolitica*, e hidrocarbonados como *C. guilliermondii* y *C. intermedia*. Muchas de estas levaduras se utilizan en los estanques de medios marinos.

*Candida kefir*, que inicialmente se la denominaba *Candida pseudotropicalis*, tiene la habilidad de asimilar y fermentar la lactosa. Estas especies son usadas para la producción de etanol o biomasas (Yamada y Kondo, 1972).

Entre el género *Candida* existen muchas especies osmotolerantes. *C. mogii*, *C. bombi*, *C. bombicola*, *C. lactoscondensi* y *C. magnoliae* crecen en néctares de frutas, leche condensada y nidos de abejas. Producen polihidroxicoholes, eritritol y otras variedades de glicerol y crecen en medios con elevadas tensiones osmóticas.

En un principio muchas de estas levaduras fueron clasificadas dentro del género *Torulopsis*, no forman esporas o pseudomicelios y ahora se han incluido en el género *Candida*.

*Candida bombicola* produce glicolípidos, compuestos por ácidos grasos hidroxilados. Los lípidos, aceites vegetales, alcanos de cadena larga y ésteres de ácidos grasos adicionados al medio son convertidos directamente a los correspondientes hidroxiácidos grasos que forman moléculas de glicolípidos y que le dan la resistencia a elevadas concentraciones de azúcares (Kurtzman *et al.*, 1983).

Hay especies del género de *Candida* que solo metabolizan los n-alcanos y utilizan muy poco azúcar, como por ejemplo *Candida bombicola* y *Candida bogoriensis*.

### 2.5.2. Características de la especie *Candida sake*.

Las proteínas solubles del citoplasma de las células son usadas para la identificación y clasificación de la especie *C. sake*. Las enzimas que son utilizadas por los organismos sirven como componentes estándar para su identificación (Kurtzman *et al.*, 1983).

Las especies del género *Candida* son cepas que muestran menores diferencias con respecto a ciertas características fisiológicas, en que el nombre genérico indica cierto grado de semejanza.

*C. sake* ha sido aislada y encontrada en el agua, leche y en la superficie de las frutas y también se han encontrado cepas de *C. sake* en el mosto de uva conservado a temperatura de refrigeración (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1988), así como también en el jugo no pasteurizado de naranja (Parish y Higgins, 1989).

En el mosto o jugo de caña de azúcar utilizado para la producción de aguardiente por fermentación, se determinó que la cepa *C. sake* se encuentra en alta concentración como contaminante del mosto (Morais *et al.*, 1997). Esta especie puede encontrarse también en el sake, la cerveza, el vino, el jugo de uva y el agua, entre otros productos naturales (Barnett *et al.*, 1990).

*C. sake* crece a una temperatura entre 1-34 °C y son miembros heterogéneos de la especie *Candida maltosa* (Saito et Ota).

### 2.5.3. Características de la cepa *Candida sake* (CPA-1).

La cepa CPA-1 de la levadura *Candida sake* (Saito y Ota) van Uden y Buckley, fue aislada de la superficie de manzanas procedentes de frigoconservación en el Laboratori de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida, y presenta una efectividad muy elevada como antagonista de los principales hongos causantes de podredumbres en postcosecha de fruta (Viñas *et al.*, 1997).

La mencionada cepa fue identificada por el “Centralbureau voor Schimmelcultures” de Holanda y se encuentra depositada en la “Colección Española de Cultivos Tipo” (CECT) de Valencia. Sus colonias presentan un color blanco cremoso, son redondas con bordes bien definidos, una superficie lisa y una ligera elevación central, además presenta pseudohifas en los cultivos.

La morfología de la células de esta levadura varía de elíptica a elíptica alargada y presenta una reproducción vegetativa por gemación multilateral.

Es importante destacar que la especie *C. sake* no se ha encontrado asociada con animales de sangre caliente (Hurley *et al.*, 1987). Además la ingestión de las dosis aplicadas en biocontrol de la referida cepa no representa ningún peligro toxicológico para la especie humana, ya que no puede desarrollarse a la temperatura de 37 °C (temperatura corporal) y es rápidamente destruida en contacto con el jugo gástrico simulado. Su dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) (Usall, 1995) es superior a  $1,7 \cdot 10^{10}$  ufc/kg, cuando se administra por vía oral a ratas Wistar.

La cepa CPA-1 está muy bien adaptada a las bajas temperaturas, obteniéndose un buen desarrollo de su población a 1 °C y presenta una buena efectividad de control de *P. expansum*, *B. cinerea* y *R. nigricans* a las condiciones de frigoconservación habitual (Viñas *et al.*, 1996; Viñas *et al.*, 1998).

Finalmente cabe mencionar que la cepa en cuestión, actualmente está patentada en el Estado Español (Viñas *et al.*, 1997) y pendiente de aprobación en 21 países a nivel internacional.

## 2.6. Producción de levaduras.

Las levaduras son cuantitativa y económicamente el grupo de microorganismos con más importancia en la industria alimenticia y fermentativa. Su tradicional aplicación se centra en la fabricación de varios productos como pan, vino, cerveza, cava, bebidas alcohólicas, sake, destilados, producción de biomasa, extractos autorizados, componentes del sabor y recientemente se está realizando la producción de recombinados proteicos a través de expresiones genéticas.

Por lo antes expuesto se deben buscar y desarrollar nuevas tecnologías de fermentaciones y cepas con mejores características y efectividad, por consiguiente a nivel industrial las levaduras son cada vez más importantes y actualmente, se están desarrollando en base a levaduras sustitutos de enzimas, sabores, esencias y proteínas (Benitez *et al.*, 1996).

De hecho el mundo de la producción de levaduras es de 2,2 - 2,4 millones de toneladas de masa fresca (con un 30 % de masa seca) por año en Europa y en Norte América (Oura *et al.*, 1982; Trivedi *et al.*, 1986). El consumo de productos en base a levaduras en países europeos es alrededor de 1,2 - 1,8 kg por habitante y año.

Las levaduras más comúnmente utilizadas en la industria corresponden a los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces*, siendo el género *Saccharomyces* el que tiene más importancia comercial (Reed y Nagodawithana, 1991).

El objetivo de la producción de levaduras debe ser el maximizar el crecimiento y minimizar la fermentación de alcoholes, por esta razón los niveles de azúcar deben mantenerse relativamente bajos para impedir la represión catabólica que determina un porcentaje de crecimiento bajo (Reed y Nagodawithana, 1991).

Centrándonos en la industria de los vinos, los dos productos finales esenciales son el CO<sub>2</sub> y el etanol, así como metabolitos con fuertes influencias en las características organolépticas del vino como aroma, flavor, color y acidez. Las levaduras que se utilizan deben tener ciertas características que son (Benítez *et al.*, 1996):

1. Alto porcentaje de fermentación y rápida iniciación de la fermentación;
2. Alta resistencia al etanol y a las temperaturas;
3. Baja producción de metabolitos no deseables como ácidos volátiles, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub> y derivados;
4. No formar espuma durante el proceso fermentativo;
5. Habilidad de flocular;
6. Utilización de ácido málico;
7. Tolerancia al CO<sub>2</sub>;
8. Buenas características organolépticas;

La mayoría de levaduras utilizadas en fermentaciones y producciones industriales deben cumplir la mayor parte de las características explicadas, por lo que se han realizado modernos cambios en los procesos de fermentación para mejorar el rendimiento a escala industrial. Se precisa un completo control durante todo el proceso de elaboración y la aplicación de cultivos propios y puros a fin de mantener productos con calidad uniforme.

Los principales parámetros que gobiernan el funcionamiento de las levaduras de destilería son:

- Temperatura;
- pH;
- Concentración de sustrato;
- Tolerancia al etanol;
- Viabilidad de nutrientes;
- Presión osmótica.

En la fermentación por levaduras de destilación hay un balance entre la productividad y la producción de etanol, ya que ambos al final de la productividad fermentativa (gramos de etanol producidos por litro por hora) disminuyen de forma importante a medida que transcurre el proceso. En consecuencia se ha de decidir a qué tiempo la fermentación se debe dar por terminada. Esto es importante en la fermentación de granos molidos de cebada durante el malteado, donde el porcentaje de fermentación hacia el final es probablemente limitado por el porcentaje enzimático, hidrolizado de dextrinas y de azúcares fermentables (Reed y Nagodawithana, 1991).

Otra dificultad es la cuestión concerniente a la concentración de azúcares fermentables en el sustrato. En granos molidos de cebada durante el malteado, la concentración puede ser controlada en algún grado por el radio de molido. En jugo de uvas, ésta es determinada por la madurez de la fruta y en las melazas se puede precisar por la dilución de las mismas.

Tradicionalmente muchas fermentaciones dan como resultado una producción de 8 a 9 % de etanol por volumen.

Las levaduras de destilación tienen una buena tolerancia al etanol porque se produce un 16 % en peso/volumen del mismo en una solución de glucosa de 30 °Brix de azúcares.

Algunas pruebas han demostrado que decrece la actividad fermentativa en sustratos que excedan los 18 °Brix. Chen (1981) determinó la efectividad de producción al suplementar los nutrientes por adición de minerales y concentraciones variables de extractos de levaduras.

Las levaduras crecen en grandes fermentadores por un proceso de alimentación continua. Los fermentadores han sido equipados con calentadores espirales y con mecanismos de aireación para mantener un alto crecimiento aerobio.

En fermentaciones líquidas, regularmente se obtiene una producción de levaduras en un 4 - 6 %, a continuación se centrifuga para concentrar y obtener una crema con un 18 a 20 % de sólidos, después la levadura es lavada y presionada o filtrada para alcanzar hasta un 30 % de sólidos que es una pasta semisólida (Reed y Nagodawithana, 1991).

Entre las nuevas innovaciones tecnológicas que se realizan, además de las antes mencionadas están:

1. Construcción de nuevos fermentadores para reducir el consumo de energía y mejorar la relación producción de biomasa/sustrato;
2. Investigación de otros sustratos alternativos además de melazas, para bajar el precio y disminuir la contaminación de los efluentes de agua;
3. Desarrollo de procesos para el tratamiento de efluentes a fin de bajar la contaminación producida por los residuos de las plantas industriales de levaduras así como el eliminar los olores emitidos durante las fermentaciones (Kreus, 1993);

Las cepas de levaduras seleccionadas a nivel comercial e industrial deben poseer los dos principales atributos que son: habilidad de fermentar de forma rápida y lograr superior actividad de fermentación con eficiente utilización de los azúcares fermentables presentes en el medio. Es decir que tengan capacidad de metabolizar diferentes sustratos como melobiosa (cuando la melaza de remolacha azucarera es usada como sustrato) o rápida utilización de lactosa (cuando el suero de la leche es utilizado como sustrato) y producción a bajo coste sin que afecte la calidad del producto. Otro importante objetivo es obtener un alto porcentaje de crecimiento y mayor productividad en biomasa.

Otra manera de mejorar la eficiencia de una fermentación es mediante la utilización de levaduras que tengan incrementada su tolerancia a factores adversos. Se seleccionan cepas que toleren altas concentraciones de azúcares en el medio de crecimiento, que tengan capacidad de mantener alta actividad fermentativa a altas concentraciones de alcoholes (Nagodawithana, 1986), con incrementada tolerancia a temperaturas o características en el control de la floculación. Estas condiciones se pueden conseguir por modificaciones genéticas.

En el área de medios de crecimiento, es de un significativo interés en la industria poder utilizar levaduras que metabolicen carbohidratos como la maltosa y la maltotriosa, a través del desarrollo de cepas con habilidad de degradar dextrinas y almidones, lo cual se consigue también por modificaciones genéticas (Benitez *et al.*, 1996).

Varios tipos de levaduras, han sufrido también modificaciones para ajustarse a las nuevas necesidades del consumidor y a las actuales estrategias de marketing, como las de panificación con mayor capacidad para fermentar azúcares (Reed y Nagodawithana, 1991).

Las levaduras de destilería deben tener características específicas, entre las cuales están la tolerancia al alcohol y una alta capacidad fermentativa. Efectos protectores de crecimiento con el etanol en actividades fermentativas han sido atribuidas a modificaciones que se dan en las

propiedades de fluidez de las membranas (Verduyn *et al.*, 1992; Loyd *et al.*, 1993; Saliola *et al.*, 1994).

La hidrólisis de los almidones y dextrinas es muy importante en la producción de bebidas de destilería, para lo cual se utilizan levaduras nativas con capacidad amilolítica como *S. diastaticus* (Rusell *et al.*, 1987) o *S. cerevisiae* de destilería con genes amiloglucosidasa (Inlow *et al.*, 1988; Hata *et al.*, 1991).

En la industria de alimentos se utilizan las levaduras para suplementar proteínas incompletas, especialmente en cereales para dietas. Numerosos experimentos han demostrado que las levaduras son buenas fuentes de proteínas y vitaminas especialmente del grupo B; siendo las especies más utilizadas para su producción *S. cereviceae*, *S. uvarum*, *C. utilis* y *Kluyveromyces fragilis* (Benitez *et al.*, 1996).

En un proceso fermentativo se realiza el crecimiento de las levaduras en grandes recipientes con capacidad entre 1,0 - 1500 l, donde el microorganismo se mantiene a la temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto y concentración de sustratos deseados. Sin embargo, el cultivo de la levadura en el fermentador es sólo una de las fases del proceso.

El medio de crecimiento debe formularse de acuerdo con los requerimientos nutricionales y las materias primas naturales más convenientes, esterilizarse y luego es inoculado con un cultivo viable y metabólicamente activo.

Después del crecimiento se separan las células de la porción líquida y se recoge la fracción que interese, bien sean las células o el sobrenadante libre de células. Debe ser supervisado todo el programa impuesto para el desarrollo del proceso.

### **2.6.1. Factores que influyen en la velocidad de crecimiento.**

Los microorganismos llevan en su genoma la información necesaria para que puedan llevar a cabo cambios estructurales o en sus unidades funcionales, y puedan responder a los cambios del medio que les rodea y poder sobrevivir (Harder y Dijkhuizen, 1983).

La velocidad de crecimiento varía con el tipo de levadura y en función de las condiciones medio ambientales, físicas y químicas.

En la velocidad de crecimiento un factor muy importante a tener en cuenta como se expuso anteriormente, es el inóculo, que puede acortar el tiempo de la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de las células. Transcurrido un período de tiempo de adaptación, las células crecen a una velocidad máxima constante, esta etapa se denomina fase logarítmica o exponencial.

Durante la fase exponencial o logarítmica, la velocidad específica de crecimiento es máxima de

acuerdo a las condiciones que se operen, y si se inocula en el medio de crecimiento un microorganismo que está en su velocidad máxima se acorta la fase de latencia y el aumento poblacional secuencial es mayor.

A medida que se agota el sustrato o se acumulan subproductos tóxicos, la velocidad específica de crecimiento se desvía del valor máximo; el crecimiento con el tiempo cesa y se entra en la fase estacionaria. La cantidad de biomasa en la fase estacionaria depende de la composición del medio y de la eficacia del microorganismo para convertir los sustratos en células.

De forma ideal, el medio debe formularse de tal manera que el factor limitante de crecimiento sea sólo el sustrato y no la acumulación de sustancias tóxicas (Trevan *et al.*, 1990).

A medida que disminuye el sustrato de crecimiento y aumentan los residuos tóxicos la proporción de células muertas es mayor que las que se reproducen, por lo que entra en la fase de muerte (Trevan *et al.*, 1990).

En general el tiempo para que se duplique la biomasa aumenta con la complejidad del microorganismo, por tanto los tiempos de duplicación medios para las levaduras son menores que para los mohos y mayores que para las bacterias (Ward, 1989).

Uno de los factores que influye mucho en la velocidad de crecimiento son los nutrientes, cuando la fuente de carbono es limitante la velocidad de crecimiento se reduce, y la concentración muy elevada de carbohidratos puede también inhibir por los efectos osmóticos de la  $a_w$ .

Inhiben o reducen el crecimiento metales pesados en muy poca concentración, como el cadmio, talio, mercurio, estaño, paladio, aluminio, vanadio y litio.

El  $SO_2$  inhibe el crecimiento de levaduras a concentraciones sobre las 100 ppm, en la fermentación secundaria del champagne se inhibe el crecimiento de las levaduras pudiendo superar el 50 % (Chen y Gutmanis, 1976). En cambio el indol, y el ácido acético producidos pueden estimular y aumentar la velocidad de crecimiento (Jakunowska y Włodarczyk, 1969).

La elevada concentración de trazas de metales en la separación de los medios de crecimiento puede ser controlada por dos vías, una por la purificación del medio y eliminación de ciertos iones de metales, o por la adición de quelantes de metales pesados que los inhibe.

Los agentes quelantes reaccionan con los metales, formando complejos que dependiendo de la estabilidad de los metales tienden a neutralizar sus propiedades y efectos tóxicos en el sustrato. Entre los quelantes naturales están los ácidos polihidroxi carboxílicos, ácidos fosfórico, aminoácidos y péptidos de proteínas y porpirinas.

Para separar el hierro en las melazas a través de la formación de complejos, se utiliza la ferrocianida, donde mejora la producción de ácido cítrico. El EDTA, o el hexacianoferrato, o el

trans-1-2-diamino ciclohexano-N,N,N',N' tetraacético, el ácido dietileno triamino pentaacético y la zeolita han sido utilizados como agentes complejantes en la producción de etanol en medio de melazas de caña de azúcar por *S. cerevisiae*, obteniéndose los mejores resultados con zeolita X para las fermentaciones alcohólicas.

El EDTA es tal vez el quelante más conocido para el magnesio y el calcio a pH 7, ácidos carboxílicos como citratos, succinatos, tartratos o acetatos son a menudo adicionados al medio para complejar el calcio, magnesio, y hierro y prevenir la formación de los componentes metalfosfato insolubles, y poder dar una reserva de cationes solubles que puedan ser utilizadas por los microorganismos.

Cistina, histidina y glicina son aminoácidos que se usan para quelar medios de cultivo. El efecto de los secuestrantes en el crecimiento de los organismos varía entre las especies ya que para unos es satisfactoria y para otros es inhibitoria (Bridson y Brecker, 1987).

Las melazas contienen nitratos que se reducen a nitritos por acción bacteriana durante el crecimiento, por lo que disminuye la producción de levaduras en concentraciones de 0,001-0,004 % (Notkina *et al.*, 1975).

Igual que las reacciones químicas, también el crecimiento celular varía en función de la temperatura y la mayoría de microorganismos tiene un buen crecimiento entre los 25 y 30 °C. Aunque la temperatura real a la que crecen depende de su naturaleza psicrófila, mesófila o termófila; moderada o extrema (Ward, 1989).

Dentro del rango, la velocidad de crecimiento aumenta con la temperatura hasta un máximo por encima del cual la velocidad disminuye rápidamente debido al incremento de la tasa de muerte.

El pH influye en el crecimiento microbiano de la misma manera que lo hace en la actividad enzimática creciendo las levaduras en un rango de pH de 3 a 4 unidades.

También la velocidad de crecimiento depende de la  $a_w$  y la humedad relativa, creciendo las levaduras en  $a_w$  entre un mínimo de 0,70 y un máximo de 0,95.

Otro factor que puede reducir la velocidad de crecimiento es la producción de espuma debido a la desnaturalización de proteínas en la interfase gas-líquido, para lo cual se utilizan antiespumantes en los procesos fermentativos (Reed, 1983).

La limitación en quimiorganotrofismo se caracteriza por la alta eficiencia en la conversión de carbono. En muchos organismos, la división del sustrato de carbono en productos extracelulares es minimizada. Bajo estas condiciones el organismo tiende a desreprimir la síntesis de enzimas catabólicas, y la síntesis de funciones anabólicas quedan ajustadas a los niveles de crecimiento (Harder y Dijkhuizen, 1983).



Una consecuencia de estos comportamientos limitantes, dependiendo de la composición particular de nutrientes de los medios de crecimiento, es el catabolismo frecuentemente en alto porcentaje o en exceso (Harder y Dijkhuizen, 1983), determinando la inhibición en su crecimiento.

Algunos productos han sido reportados como activadores del crecimiento de levaduras, como los residuos de la molienda de las harinas y el lodo de los digestores aerobios, las cuales actúan en los medios de crecimiento que presentan deficiencias de vitaminas o trazas de elementos, como coadyuvantes y estimulantes. Otros que se utilizan ocasionalmente son indol y ácido acético (Jakubowska y Wlodarczyk, 1969; Reed, 1983).

### **2.6.2. Características del inóculo.**

Para el crecimiento de una levadura en fermentador a gran escala uno de los principales aspectos a considerar es la calidad del inóculo a sembrar. Se debe disponer de una cantidad de cultivo suficiente para inocular el medio del fermentador. Este inóculo debe ser metabólicamente activo, estar libre de contaminantes y ser capaz de producir el producto que se quiere obtener.

Si se utiliza un fermentador con unos 100 l de medio de cultivo, el inóculo debe estar comprendido entre 3 y 10 l. Se prepara a partir de un cultivo inicial, lo que conlleva a un gran número de fermentaciones sucesivas a una escala cada vez mayor. Cuanto mayor sea el número de pasos entre el cultivo madre y la fermentación final, mayor será el riesgo de contaminación y degeneración de la cepa. Por lo que en lugar de utilizar células procedentes de una fermentación final para inocular en el fermentador, se debe preparar un inóculo nuevo a partir de un cultivo madre original para cada lote que se fabrique, el cual se recomienda haber crecido en el mismo medio en el que se va a fermentar.

Hay dos excepciones que son para la producción de vinagre y cerveza, en que las células de levaduras cerveceras procedentes de lotes fabricados se utilizan como inóculo para la producción del lote siguiente, el cual se realiza retirando aproximadamente el 60 % del cultivo (Trevan *et al.*, 1990).

### **2.6.3. Condiciones a tener en cuenta durante procesos fermentativos.**

Durante un proceso fermentativo se debe trabajar en condiciones asépticas utilizando un inóculo puro de levadura libre de otros microorganismos contaminantes, por lo que el bioreactor y las tuberías se deben diseñar para que puedan ser esterilizadas a temperaturas de 121 °C a 1,5 atmósferas de presión durante un tiempo de 15 a 30 minutos. Las válvulas, puntos de entrada al recipiente y el proceso de incorporación y eliminación de gases o líquidos durante la fermentación también deben estar diseñados para mantener condiciones asépticas, pero no todos los procesos de fermentación requieren condiciones totalmente estériles (Ward, 1989).

Los medios de crecimiento a utilizar se deben esterilizar por diferentes métodos, algunos de estos medios pueden tener un pH muy ácido, el cual se corrige y se esteriliza luego. Es más conveniente esterilizar por filtración porque el calentamiento puede hidrolizar el complejo azúcar y formar productos oxidativos, siendo mayor la descomposición a pH sobre 7, especialmente en soluciones concentradas (Bridson y Brecker, 1987).

El medio para el almacenamiento y subcultivo de cepas industriales se debe preparar de manera que conserve las características necesarias que permitan el mantenimiento de un alto grado de viabilidad para el cultivo minimizar la producción de metabolitos tóxicos para el organismo y la variación genética (Ward, 1989).

Los medios de cultivo con jugo de caña de azúcar generalmente presentan problemas de contaminación microbiana por bacterias lácticas y ácidos, como *Pseudomonas acidovorans*, y enterobacterias que presentan una sensibilidad diferente al CTAB (cetil trimetil amonio bromuro); siendo remarcable la resistencia de *Pseudomonas* que se puede deber a la permeabilidad al CTAB. Otras bacterias, en cambio, son muy sensibles.

Entre las condiciones medioambientales que han demostrado influir en la morfología y crecimiento están la viscosidad, y los cationes divalentes. Influyen en la floculación y en los componentes celulares de las levaduras y están implicados en su entrecruzamiento. También se encuentran los agentes quelantes, polímeros aniónicos y agentes tensoactivos, que influyen en la sedimentación y separación de las levaduras, hecho muy importante para la industria.

Los niveles bajos de nitrógeno en forma de complejos inducen la formación de esporas y las concentraciones altas de aminoácidos las inhiben (Ward, 1989).

#### **2.6.4. Medios de crecimiento utilizados para la producción.**

Para el crecimiento de levaduras los medios deben tener algunos componentes que son indispensables y son (Bridson y Brecker, 1987):

- Fuentes de carbono;
- Componentes proteicos, péptidos y aminoácidos;
- Vitaminas;
- Minerales, metales e iones inorgánicos;
- Componentes de material genético, purinas y derivados de pirimidinas;
- Fuentes de energía;
- Soluciones tamponantes.

Actualmente, las fuentes de carbono alternativas y energía más utilizadas son materias primas renovables que contienen azúcar como la glucosa, el almidón, y en menor extensión grasa y aceite. Se utilizan productos basados en hidratos de carbono, como la lignocelulosa para la producción de biomasa, malta, melaza de remolacha azucarera, melaza de caña de azúcar, aceite vegetal e hidrocarburos (Trevan *et al.*, 1990).

Entre las fuentes de nitrógeno están el amoníaco, sales amónicas, nitratos, macerado de maíz, gránulos de cacahuete, harina de soja, sangre deshidratada, solubles de destilería, extracto de levadura de cerveza, germinado de cebada, lactosuero y bagazo de cebada (Trevan *et al.*, 1990).

Otras alternativas de medios de crecimiento para levaduras de panificación puede ser la celulosa, pero es un proceso costoso, también está el sirope de maíz, que es una buena fuente de glucosa (Bronn, 1985).

Hay levaduras que pueden hidrolizar el almidón, pero como *S. cerevisiae* no lo puede hidrolizar se ha hecho la inserción de genes en levaduras de cerveza para producir glucoamilasa y que pueda hidrolizarlo (McCann y Barnett, 1986). Para las levaduras de cervecería se emplea el mosto que tiene azúcares en mayor proporción que las harinas, que tan sólo contienen un 1 - 2 % de azúcares fermentables (Friedimann *et al.*, 1967).

Sustratos complejos como tejidos de plantas, subproductos animales, vegetales y microbianos suministran vitaminas, factores de crecimiento y minerales necesarios para el crecimiento de las levaduras. También raíces de plantas y cereales contienen elevadas fuentes de nitrógeno (Ward, 1989).

La sacarosa se utiliza en forma cristalina o la contenida en zumos o melazas, o subproductos de la manufactura de azúcares. Aunque el azúcar de las melazas es más barato y la composición de las mismas varía si es melaza de caña de azúcar o de remolacha azucarera, también influye la calidad del cultivo y la naturaleza del proceso de refinado del azúcar por lo que la reproductividad de las fermentaciones no es igual (Ward, 1989).

La glucosa se obtiene de medios de fermentación a partir de la conversión enzimática directa del almidón. Se puede utilizar refinada pero es más cara, o en forma de cristales o de jarabe. Se utilizan como suplementos de hidratos de carbono el aceite vegetal de soja, de palma o semilla de algodón. También se utiliza metanol o etanol en la producción de proteínas u organismos unicelulares (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### **2.6.4.1. Derivados de la cebada germinada y malta.**

Históricamente el extracto de malta es el medio más viejo y clásico usado como mayor fuente de carbono puesto que contiene carbohidratos en un 90 - 92 % .

El mosto sólido se utiliza para el crecimiento de las levaduras y mohos por su pH ácido y alto nivel de azúcares reductores (Bridson y Brecker, 1987). Contiene nitrógeno en un 4 - 5 %, sales minerales y vitaminas y otros componentes como lípidos, grasa, ácidos orgánicos, fosfatos, compuestos sulfurados y componentes inorgánicos; es soluble en agua y es producto del malteado del trigo. Los derivados de la malta o el caldo de cerveza son muy utilizados para el crecimiento de levaduras y debido a la fermentación de carbohidratos pueden suplir la fuente de energía necesaria (Reed y Nagodawithana, 1991).

El mosto de malta entre los principales carbohidratos fermentables contiene glucosa en un 14 %, fructosa en un 1 %, sacarosa en un 6 %, maltosa en un 59 %, maltotriosa en un 20 %, polímeros de glucosa y dextrinas (Reed y Nagodawithana, 1991). Además posee de entre 65 - 100 mg de nitrógeno por 100 ml de medio, del cual aproximadamente el 30 % son  $\alpha$ -aminonitrógeno compuestos, el 20 % son proteínas de alto peso molecular, el 40 % son polipéptidos y el 10 % representa nitrógeno en forma de piruvatos y otros compuestos (Thorne, 1949).

Entre las vitaminas contiene biotina, ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, riboflavina y tiamina; minerales como potasio, sodio y calcio, y presentes en pequeña cantidad está hierro, zinc y magnesio (Bridson y Brecker, 1987).

Para su uso como medio de cultivo, el extracto de malta debe estar libre de actividad diastática, dicha actividad se elimina con el vapor producido durante la esterilización, pero no se debe sobrecalentar durante la esterilización (Mc William y Chapperton, 1986).

El mosto de malta generalmente presenta una mayor relación magnesio:calcio comparado con otros sustratos de fermentación. La optimización de las funciones bioquímicas esenciales del magnesio aumentan la velocidad de crecimiento y producción de etanol en el caso de *S. cerevisiae* (Walker *et al.*, 1996)

#### **2.6.4.2. Melazas.**

De acuerdo con los tradicionales métodos de producción de levaduras, otro medio común para el crecimiento de levaduras contiene una mezcla de melaza de caña de azúcar y de melaza de remolacha azucarera para completar el contenido de vitaminas y minerales (Imrie, 1969; Burrows, 1970; Reed y Nagodawithana, 1991). Es recomendado usar un mínimo de 10 - 20 % de melaza de caña de azúcar para cubrir la deficiencia de biotina. Las melazas mezcladas se diluyen con agua hasta obtener un 25 % de azúcares fermentables (Degre, 1994). Esta proporción es adecuada por ser económica y fácil de utilizar.

Schaffler *et al.* (1997) analizan la variación de la composición en azúcares de varias muestras de la melaza de caña de azúcar y de remolacha azucarera, procedentes de varios países, por

cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se obtiene que la melaza de caña de azúcar contiene un 31,6 % de sacarosa con una desviación estándar (st) del 0,8 %, un 3,6 % de glucosa con un st del 1,7 % y fructosa en un 6,5 % con un st del 1,2 %. La melaza de remolacha azucarera contiene un 50,6 % de sacarosa con un st del 0,6 %, mostrando que no existe una gran variación en composición de azúcares en varias muestras de melazas. La glucosa, fructosa, sacarosa y fracciones de rafinosa de las melazas sirven como fuentes de carbono para el crecimiento, teniendo en cuenta que la sacarosa es el azúcar predominante en las dos melazas.

La melaza de remolacha azucarera contiene un 50 % de azúcar, del cual mayoritariamente es fructosa (Degre, 1994), y la rafinosa en un porcentaje del 0,5 al 8 % (Reed y Nagodawithana, 1991; Benítez *et al.*, 1996).

Las levaduras de panificación pueden hidrolizar la melobiosa por acción de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa y permite la completa asimilación de la rafinosa (Liljeström *et al.*, 1988)

Las invertasas presentes en las levaduras de panificación producen fructosa y melobiosa de la rafinosa. La fructosa es la que se asimila, en tanto que la melobiosa no tiene capacidad de utilizarla; una posibilidad para asimilarla es a través de manipulación genética (Benítez *et al.*, 1996).

Las melazas de caña de azúcar contienen sacarosa, que representa las dos terceras partes del total de su contenido de azúcar, el resto es glucosa y fructosa (Degre, 1994). Proveen no sólo de azúcar como fuente de carbono y energía sino que es fuente de algunos compuestos orgánicos nitrogenados, minerales sulfurosos, vitaminas y trazas de elementos. Presenta deficiencia de fuentes de nitrógeno, por lo que el medio líquido debe ser suplementado con amonio o sales de amonio o fosfatos y una adición de minerales de calcio, magnesio y trazas de elementos y vitaminas (Ingledew y Kunkee, 1985; Dhamankar, 1992).

Unos 100 g de melaza de remolacha azucarera es una fuente de carbono suficiente para el crecimiento de 27 g de levadura sólida; contiene aproximadamente 50 % de azúcares que son principalmente sacarosa (en la melaza de caña de azúcar son dos terceras partes), el resto es glucosa y fructosa.

Actualmente, la melaza de la caña de azúcar es generalmente utilizada en las áreas subtropicales donde crece la caña. En zonas del norte de climas más fríos se utilizan las melazas de remolacha azucarera, y en la industria de las fermentaciones se utilizan para la producción de levaduras para panificación. Las melazas son las fuentes de azúcares fermentables mas baratas.

La calidad de las melazas ha ido declinando en los últimos años debido a la introducción de nuevas tecnologías en los procesos industriales para la obtención de azúcar, por lo que actualmente se están buscando otras fuentes o medios de crecimiento para levaduras, ya que puede haber una

deficiencia de nutrientes y una presencia de ácidos grasos, nitritos, bacterias, insecticidas o herbicidas utilizados en la cosecha (Bergander, 1969; Notkina *et al.*, 1975).

Las melazas pueden ser almacenadas por mucho tiempo. Contienen materiales insolubles, pero se clarifican. La melaza de caña de azúcar no se puede filtrar bien porque contiene sustancias coloidales que lo dificultan y son clarificadas mediante la adición de fosfato. Algunos medios de melazas son modificados a pH aproximadamente de 5 con ácido sulfúrico y los sólidos insolubles son eliminados por centrifugación con descarga intermitente (Reed y Nagodawithana; 1991 Degre, 1994).

Las melazas de remolacha azucarera son relativamente fáciles de clarificar, sólo se hace por filtración.

Las melazas generalmente tienen aproximadamente unos 80 °Brix y antes de la clarificación es conveniente diluir el medio con agua hasta llegar a 34-40 °Brix, para facilitar el proceso y bombeo (Ceijke, 1983).

Los medios son esterilizados con cambios bruscos de calor a 140 - 145 °C durante un segundo y es mantenido a esta temperatura por cuatro segundos. La esterilización se realiza en recipientes sometidos a presión, que permiten la evaporación de compuestos volátiles nocivos como ácido fórmico, butírico, propiónico y alcanos derivados que afectan el crecimiento de las levaduras, y al final se mantiene un tiempo a 95 °C. No se debe calentar excesivamente o almacenar por prolongados tiempos porque se pueden caramelizar los azúcares fermentables. Se almacena a temperaturas entre 4 y 60 °C (Degre, 1994).

Como sustrato de fermentación, conjuntamente con el mosto de vino, posee una relación en concentración Mg:Ca que normalmente está a favor del calcio. Esto es considerado perjudicial para el crecimiento de las levaduras y producción del etanol por antagonismo del calcio con funciones bioquímicas esenciales del magnesio. Por lo tanto, aumentando la relación magnesio:calcio en los medios de crecimiento, suplementando con magnesio o con células preacondicionadas en niveles elevados de magnesio, la actividad fermentativa es mejorada, tanto en términos de velocidad como en rendimiento de etanol (Walker *et al.*, 1996).

#### **2.6.4.2.1. Utilización de derivados de la caña de azúcar y remolacha azucarera para el crecimiento de microorganismos.**

Las melazas en combinación con el extracto de levadura de cerveza como medio de crecimiento para antagonistas se han utilizado en la producción de *Coniothyrium minutans*, que actúa en el control de la infección de *Sclerotinia sclerotiorum*. Actúa reduciendo su viabilidad y supervivencia en el suelo donde crecen zanahorias, cebollas, lechugas, patatas, reducen de esta manera su

germinación carpogenética e infección de las verduras, obteniéndose altos valores de producción (McQuilken *et al.*, 1997).

El hidrolizado del bagazo de la caña de azúcar y el caldo resultante de la producción de azúcar, también se han utilizado como medio de crecimiento de *Chaetium rectum* en medio enriquecido con urea como fuente de nitrógeno, donde se determina que el microorganismo no necesita enriquecimiento con sales para mejorar su crecimiento (Stamford *et al.*, 1991).

*Candida parakrusei*, *Hansenula suavelens*, aisladas del alcohol del azúcar han sido estudiadas para la producción de lípidos, utilizando el medio de melaza de caña de azúcar suplementado con cloruro de sodio y patenato de calcio, como medio de cultivo, obteniéndose buenos resultados de crecimiento y producción de lípidos (Celligoi *et al.*, 1997).

*Candida guilliermondii* presenta un buen crecimiento en medio de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, suplementado con sulfato de amonio y cloruro de calcio. Se observó que a pH 4,5 se obtenía una alta producción de xilitol a partir de la xilosa contenida en los hidrolizados de lignocelulosa del bagazo de caña de azúcar, y a pH inferiores a 4,5 el ácido acético que no está ionizado inhibe el crecimiento de la levadura (Felipe *et al.*, 1997).

*S. cerevisiae* crecida en medio de melazas ajustado a pH 7, diluido para alcanzar bajas concentraciones de glucosa y sacarosa, y enriquecido con sulfato de amonio, sulfato de magnesio y fosfato hidrógeno de sodio es utilizado para la producción de azúcares invertidos con alimentación de una proporción de sacarosa. Se debe controlar la concentración de glucosa para evitar que sus altas concentraciones reduzcan la actividad invertasa de las células (Vitolo *et al.*, 1995).

En la producción de varios productos recombinados *Escherichia coli*, utiliza la glucosa como fuente de carbono, siendo un buen sustrato para su crecimiento el medio de melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera.

#### **2.6.4.3. Almidón.**

El almidón es uno de los medios más utilizados y se encuentra en granos o molidos de maíz, arroz, trigo, patatas, mandioca o almidón purificado o modificado como dextrinas.

Esterilizando el medio, se gelifica y se hace muy viscoso, por lo que previamente debe hacerse una hidrólisis enzimática cuya función es licuar y clarificar; esto se hace empleando amilasas procedentes de fuentes microbianas o cereales malteados.

La hidrólisis depende de la cepa microbiana, si produce o no amilasas y si la síntesis del producto está sujeta a represión por el catabolito (Reed y Nagodawithana, 1991).

#### 2.6.4.4. Suero de la leche.

Otra alternativa es el suero de la leche, producido en abundancia en la fabricación del queso, por lo tanto es barato. Tiene capacidad de ser utilizado como sustrato de procesos biotecnológicos para la producción de etanol, ácido láctico y ácido cítrico, biomasa de proteínas y para crecimiento de levaduras (Gassem *et al.*, 1997).

La lactosa es su principal azúcar, pero no todas las levaduras tienen el sistema de enzimas que se requiere para asimilarla como fuente de carbono.

El crecimiento de bacterias ácido-lácticas y productoras de polisacáridos puede proveer polímeros que se pueden utilizar como estabilizadores de alimentos como los exopolisacáridos. *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* RR. convierte la lactosa en exopolisacáridos en medios de lactosuero ajustando el pH a 6,2 y enriqueciéndolos con nutrientes (Gassem *et al.*, 1997).

Por la rica composición del lactosuero en lactosa, minerales y proteínas, microorganismos como *K. fragilis* son capaces de utilizar la lactosa, dando una baja producción de etanol que es incrementado si el proceso fermentativo se realiza en un medio con un 12 % de lactosa en el lactosuero y en un rango de temperatura de 35 - 40 °C (Szcodrak *et al.*, 1997).

Existen pocas especies como *Kluyveromyces marxianus*, que utilicen la lactosa, pero son levaduras poco empleadas (Bruinsma y Nagodawithana, 1987). Se necesita desarrollar nuevas levaduras con capacidad de utilizar la lactosa, es decir, que tengan un sistema enzimático constituido por una permeasa que transporte las moléculas de lactosa al interior de la célula y una  $\beta$ -galactosidasa que hidrolice la lactosa en los dos azúcares asimilables que son glucosa y galactosa.

La lactosa puede ser hidrolizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, pero es costoso el proceso de hidrólisis y almacenaje.

*S. fragilis* o *K. fragilis*, levaduras de panificación, no pueden asimilar la lactosa pero crecen en el medio de glucosa y galactosa resultante de la hidrólisis de la lactosa (Mouling y Galzy, 1984; Sanderson y Reed, 1985), debido a la introducción del gen LAC en las levaduras de panificación (Sreekrishna y Dickson, 1985).

En el suero de la leche entera o desproteïnizada hay un 4 o 5 % de lactosa, que se utiliza como fuente barata de carbohidratos y medio de fermentación para la producción de alcohol (Ward, 1989). El lactosuero tiene muchas cualidades nutritivas por su alta concentración de minerales y proteínas (Penna *et al.*, 1997).

Los lactosueros ácidos poseen alta concentración de ácido láctico que limita el crecimiento de algunos microorganismos, en tanto que cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* spp. resisten el bajo pH de este medio (Marsall y Tamine, 1997).

#### 2.6.4.5. Mosto de uva.

Los azúcares fermentables en el mosto de uva son glucosa y fructosa. La concentración de los azúcares en uvas maduras se expresa por lo general en grados Brix, que varían de 20 a 24; el porcentaje de glucosa y fructosa varían de forma importante y se encuentran aproximadamente en proporción 1:1 en uvas muy maduras (Amerine y Thoukis, 1958).

Los niveles de nitrógeno del mosto varían, pero aproximadamente tienen amonio en un 3-10 %, aminoácidos en un 25-30 %, péptidos en un 25-40 % y proteínas en un 5-10 % (Lafon-Lafourcade, 1983).

El vino producido por *S. cerevisiae* asimila compuestos de nitrógeno. Los aminoácidos y péptidos los asimilan cuando son hidrolizados a compuestos más simples.

#### 2.6.4.6. Extracto de levaduras.

El extracto de levaduras es descrito como una sustancia derivada de las células de *Saccharomyces* y es preparada por autólisis o plasmólisis de células de levadura. Se encuentra como pasta o polvo (Bridson y Brecker, 1987).

El extracto de levadura contiene en su composición una mezcla de aminoácidos y péptidos, vitaminas solubles en agua, vitaminas del complejo B y carbohidratos. Los carbohidratos principalmente son glucógeno, glucano y trealosa, y por hidrólisis se transforman en glucosa (Gaudreau *et al.*, 1997).

El extracto de levadura de cerveza se prefiere al de levadura de panificación (Harrison, 1967).

Como medio de cultivo, favorece el crecimiento de las bacterias lácticas (Smith *et al.*, 1975). Su composición rica en aminoácidos, nucleótidos y constituyentes inorgánicos estimula el crecimiento de lactococos (Gaudreau *et al.*, 1997).

Gaudreau *et al.*, (1997) indicaron que al adicionar 10 g/l de lactosuero deshidratado, se consiguen concentraciones de un 75 % de lactosa, en un medio con 70 g/l de extracto de levadura de cerveza; medio óptimo para la producción por parte del *Lactococcus lactis* spp. *lactis* AD de altas concentraciones de diacetilo y ácido láctico, por encima de estas concentraciones se inhibe su producción.

#### 2.6.5. Medios de crecimiento económicos: requisitos.

Para la fabricación de una levadura a nivel industrial, deben analizarse varios aspectos como son: la calidad de la cepa, el medio en el cual debe crecer, los equipamientos para su producción, técnicas de esterilización, el mantenimiento de condiciones asépticas, la técnica para su recuperación y que los costes se encuentren dentro de un precio competitivo.

Centrándose en el microorganismo que se va a producir: debe tener un periodo de tiempo corto de reproducción, permitir la máxima utilización de equipamientos, las materias primas para su medio de crecimiento deben ser baratas y el producto debe ser de fácil purificación y recuperación. Debido a ello, las investigaciones se deben orientar teniendo en cuenta estas consideraciones de forma que los resultados sean aplicables a procesos industriales competitivos (Whitaker, 1973).

El medio de crecimiento del microorganismo contribuye en el 21-84 % en el coste total de producción, y tiene un gran efecto en todo el coste del proceso de fermentación, dentro del cual el precio de la fuente de carbono influye mayoritariamente.

Las materias primas se deben seleccionar en función de su precio y calidad. En el caso de materias primas naturales su precio varía en función de la demanda, cosecha y tiene una composición variable.

En los últimos años se han utilizado las melazas como medios de cultivo, pero se está experimentando con nuevas materias primas como derivados de granos de cebada y trigo, patatas, infusión de maíz, derivados de otros procesos fermentativos. Dentro de la selección del medio de cultivo se debe considerar la facilidad de adquisición, en el caso de ser un producto estacional que se debe almacenar.

Se están investigando otros potenciales medios de producción como residuos sulfurados de las industrias del papel, leche desnatada, lactosa y residuos de la patata (Tweit, 1967).

Existe mucha información sobre el coste de la implementación de la planta y de los equipos necesarios para los procesos fermentativos. En base a varios análisis se considera que constituye el 10 - 15 % del total del precio de producción (Hastings y Jackson, 1967).

La esterilización del medio de crecimiento se puede realizar *in situ* en el reactor o en recipientes separados, y de allí ser transferidos asépticamente al fermentador, por lo que el coste de la construcción de los equipos de esterilización está incluido en el equipo de fermentación. El método de fermentación varía si la fermentación es continua, en cuyo caso es conveniente realizar la esterilización aparte. En el caso de que no fuese continua, se debe considerar la frecuencia de producción, siendo mejor tener un recipiente aparte para realizar esterilizaciones frecuentes (Whitaker, 1973).

El periodo de tiempo entre la inoculación y la recogida del producto del fermentador es un factor crítico en la economía del coste de producción.

Procesos fermentativos con un corto periodo de incubación son, generalmente menos costosos. En cambio, largos periodos de incubación además de aumentar el coste de producción corren el peligro de frecuentes contaminaciones, por lo que es conveniente determinar las mejores

condiciones que permitan obtener mayores porcentajes de producción en el menor tiempo posible (Richards, 1968).

La recuperación de los productos de la fermentación de los posibles medios de cultivo pueden ser por filtración, extracción, centrifugación o evaporación. El método utilizado varía en función de su comercialización.

También se debe considerar el mecanismo de aireación y agitación. Según el mecanismo con el cual se realice se incluye en los costes del equipamiento del fermentador, que varía según la capacidad y grado de tecnificación del equipo.

#### **2.6.6. Criterios utilizados para la preparación de un medio.**

Los medios de fermentación y crecimiento de levaduras a nivel industrial deben contener todos los elementos nutricionales necesarios para la síntesis de material celular y deben estar en concordancia con los objetivos técnicos del proceso, ofreciendo un medio ambiente favorable para el crecimiento y/o formación de producto, y a la vez ser económicos, rentables y de fácil manejo.

El medio de cultivo que se utilice en la fermentación no sólo debe cubrir las necesidades nutritivas de la levadura, sino también las exigencias del proceso industrial. Por ello deben tenerse en cuenta una serie de factores importantes para la preparación del medio, entre ellos el coste, la eficacia de la utilización y la reología del medio de cultivo.

Todos los microorganismos requieren agua, fuentes de carbono y nitrógeno, elementos minerales y algunos nutrientes específicos como vitaminas y aminoácidos. La mayoría de los microorganismos comercialmente importantes son quimioorganotróficos y por tanto la fuente de energía y carbono es la misma (Trevan *et al.*, 1990).

El carbono y nitrógeno generalmente se suministran en forma de mezcla compleja de productos naturales y baratos, o son subproductos de otro proceso. Los elementos traza existen normalmente en la materia prima que sirve de sustrato o en el agua corriente que se utiliza en la preparación del medio.

Cualquier nutriente específico que se requiera, como vitaminas o aminoácidos, debe añadirse en forma pura pero puede que exista también en el mercado como un extracto de origen animal o vegetal. Los fosfatos deben incorporarse al medio como agentes tamponantes aunque normalmente el pH se controla externamente.<sup>1</sup>

La fuente de carbono influye en el diseño del fermentador para que se suministre oxígeno suficiente que permita su completa utilización, y se debe considerar la manera de liberar la energía calorífica que se genere a través de un intercambiador de calor adecuado (Trevan *et al.*, 1990).

Los procesos a seguir en el estudio y desarrollo de un nuevo medio de crecimiento son:

- Crecimiento del inóculo.
- Desarrollo y crecimiento de la levadura a pequeña escala con el objetivo de conseguir velocidades de crecimiento altas para disponer de niveles elevados de biomasa viables y en una forma fisiológica adecuada para ser utilizada como inóculo en la siguiente etapa. Para ello se hace su crecimiento en un medio igual o similar al que se utilizará en la producción a nivel industrial, el cual se va modificando con el fin de lograr las mejores condiciones de crecimiento de la levadura.
- Formación del producto en el fermentado industrial, diseño del medio y las condiciones de fermentación o crecimiento que permitan velocidades elevadas con altos rendimientos de masas de células viables (Ward, 1989).
- Otro punto a considerar es la comercialización de la levadura producida, es decir, la formulación que se necesita para presentar el producto con capacidad de ser utilizado en condiciones óptimas de eficacia, estabilidad, seguridad y fácil aplicación.

El tipo de formulación usado depende de la tecnología con la cual será aplicada y la viabilidad que presente frente a los ingredientes que vayan incluidos en la misma se consideran las propiedades físico-químicas como volatilidad, punto de ebullición, comportamiento con la levadura y el lugar donde será administrada (Barlow, 1985).

Adicionalmente la formulación debe ser fácilmente adaptable a modificaciones en función de los cambios que la demanda del usuario requiera y de los envases con que se comercialice. Actualmente se está dando la tendencia de usar envases biodegradables con el objetivo de evitar la contaminación del ambiente, así como también bases de formulaciones sólidas y líquidas (Rhodes, 1993).

Con relación a los agentes de biocontrol, la diferencia más importante entre éstos y los químicos, es que los primeros son organismos vivos con capacidad de replicarse en el ambiente y frecuentemente requieren multiplicarse después de su aplicación para controlar al patógeno en la zona donde se ha inoculado. Son células, esporas, virus o estructuras multicelulares, en que la integridad de sus estructuras no deben ser destruidas con la consecuente inactivación de su acción por los aditivos utilizados en su formulación (Rhodes, 1993).

La formulación por lo tanto debe proveer de condiciones en las cuales se mantenga la viabilidad del antagonista durante su preparación, almacenamiento y aplicación y favorecer la supervivencia del mismo en el ambiente, el tiempo necesario para ejercer su control biológico (Rhodes, 1993).

