



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

# ***Resultados y Discusión***

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1. Pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en diferentes medios de cultivo.

Los medios utilizados en el cultivo de levaduras contienen todos los elementos necesarios para la síntesis del material celular. En la investigación de laboratorio para la obtención de medios de cultivo se utilizan productos químicos definidos puros.

Pero a nivel industrial y por motivos económicos, generalmente se utilizan sustratos complejos poco definidos cuantitativamente.

Las melazas, los caldos de maltosa, el mosto de uvas, la masa de pan, los residuos de líquidos sulfitados de la industria del papel, y los hidrocarburos, son probablemente los sustratos comerciales más importantes utilizados actualmente para la producción de levaduras.

El hidrolizado de almidón y el lactosuero de queso pueden ser usados para la producción de etanol.

Los resultados del estudio bibliográfico realizado para seleccionar los productos o subproductos agroalimentarios más adecuados para el crecimiento de levaduras en base a su composición, bajo coste y facilidad de adquisición han sido los siguientes:

- **Levadura de cerveza.**

El extracto de levadura de cerveza utilizado varias veces para la fermentación del mosto malteado de cebada es el subproducto de la levadura de cerveza, contiene también residuos de lúpulo y otros aditivos que varían en función del tipo de cerveza, por lo que es un medio complejo y de composición variable (Adamic, 1977).

Su composición nutritiva es rica en aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos. El glucógeno y la trealosa de las células de levaduras que contiene el medio se hidrolizan a glucosa (Crueger y Crueger, 1993).

- **Germen de cebada.**

El germen de cebada está constituido por tallos, brotes y cascarillas de la cebada germinada, que son separados de la malta después de la maduración y corresponde al 3 - 5 % del peso de la cebada (Briggs *et al.*, 1991).

Su calidad nutritiva varía en función del grano: es rica en fuentes de carbono, vitaminas del

complejo B y E, péptidos, aminoácidos y proteínas como fuente de nitrógeno. Aproximadamente las tres cuartas partes de la proteína cruda es proteína verdadera, rica en lisina, betaína, tiramina y otros aminoácidos.

Durante la maduración o malteado de la cebada, en los brotes se acumulan altos niveles de factores de crecimiento, semejantes a los que precisan las levaduras y que son usadas para producir riboflavina (Briggs *et al.*, 1991).

- **Bagazo de cebada.**

El bagazo de cebada es un subproducto de la producción de cerveza por la hidrólisis amiloláctica de los polisacáridos de los granos de cebada durante el malteado (Stanbury *et al.*, 1995).

Contiene: almidón, dextrinas, maltotetrosa, maltotriosa, maltosa, glucosa, fructosa y sacarosa. Las levaduras utilizan primero la glucosa de la mezcla de hexosas, luego la fructosa y sacarosa y al final la maltosa, que les es más difícil metabolizar.

Contiene también nitrógeno amoniacal y  $\alpha$ -amino nitrógeno, proteínas, péptidos y aminoácidos que varían en función de la calidad del grano (Bridson y Brecker, 1987), pero no es suficiente para el crecimiento y fermentación de algunas levaduras.

Es rico en vitaminas como biotina, ácido pantoténico, inositol, riboflavina, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, así como en minerales necesarios para el crecimiento de levaduras (Briggs *et al.*, 1991).

- **Concentrado de zumo de manzana.**

El concentrado de zumo de manzana, no es utilizado para la producción de levaduras, pero al ser la manzana el fruto de donde fue aislado el microorganismo objeto del presente trabajo, se incluye como medio para su producción.

Se obtiene a partir de la evaporación del zumo de manzana pasteurizado y despectinizado con evaporadores al vacío. Es rico en ácido málico que corresponde al 0,5 % del contenido total del zumo y en ácido galacturónico que se produce por la ruptura de las pectinas.

La vitamina C, o ácido ascórbico, se degrada durante su proceso de fabricación al ser sometido a elevadas temperaturas.

Los azúcares presentes son: la fructosa, glucosa, sacarosa y xilosa. Es predominante la fructosa que corresponde a las 2/3 partes del total de azúcares (Varnam y Sutherland, 1994).

- **Lactosuero**

En el caso del lactosuero, se puede utilizar directamente como sustrato de desarrollo de cepas de *Saccharomyces* spp. metabolizando la lactosa. Generalmente después de ser hidrolizado a glucosa y galactosa, o bien convertido a ácido láctico (Madrid, 1981; Reed y Nagodawithana, 1991), sirve de medio de cultivo para la producción de *Saccharomyces* spp. (Spreer, 1991).

La lactosa del lactosuero, como fuente de carbono y energía, se utiliza también para la producción de *Kluyveromyces lactis* y *Candida pseudotropicalis* (Castillo, 1990), que son levaduras que contienen enzimas que la degradan.

Según el tipo de lactosuero obtenido de la producción de quesos, y en función de los requerimientos nutricionales de las levaduras, muchos deben ser suplementados con fuentes de nitrógeno como sales de amonio (Spreer, 1991), fósforo que está presente en suficientes cantidades (Castillo *et al.*, 1979), trazas de compuestos inorgánicos que están en concentraciones adecuadas, y vitaminas que son insuficientes y se deben suplementar (Meyrath y Bayer, 1979) en función de los requerimientos nutricionales de la levadura.

- **Melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera.**

Las melazas de caña de azúcar y remolacha azucarera son ampliamente utilizadas para la producción de levaduras de panificación (Spencer y Spencer, 1997) y es una de las fuentes de carbohidratos más barata.

La melaza de caña de azúcar difiere en su composición y eficiencia en función de las técnicas empleadas para la refinación y extracción del azúcar del jugo de caña y de la materia prima usada para la producción de azúcar (Reed y Nagodawithana, 1991).

Contienen muchas impurezas, como sólidos suspendidos, coloides, nitritos, nitratos, fungicidas (Beudeker *et al.*, 1989), por lo que según su utilización necesitan en ocasiones una purificación o una extracción (Stanbury *et al.*, 1995). Hay también variaciones en la calidad de las melazas, dependiendo de la localidad, las condiciones climáticas y el proceso de producción.

La principal fuente de carbono y energía presente en las melazas es la sacarosa (Beudeker *et al.*, 1989). Melazas de caña de azúcar y remolacha azucarera contienen aproximadamente un 50 % de azúcares residuales, existiendo a la vez azúcares invertidos en la melaza de caña de azúcar.

Las dos melazas contienen varios tipos de componentes nitrogenados: aminoácidos, purinas y pirimidinas y componentes no metabolizables como betaina en la melaza de remolacha azucarera y 5-metil-citosina en la melaza de caña de azúcar.

El total de nitrógeno contenido en la melaza de remolacha azucarera es del 0,2 al 2,5 % mientras

que en melaza de caña de azúcar es del 0,4 al 1,4 % (Spencer y Spencer, 1997). Estos porcentajes no son suficientes para la producción de levaduras.

Los niveles de biotina son 120 mg/100 g en melaza de caña de azúcar y de 5,3 mg/100 g en melaza de remolacha azucarera. Se puede complementar la deficiencia utilizando una mezcla de las dos melazas (Beudeker *et al.*, 1989; Imrie, 1969; Reed y Nagodawithana, 1991).

El pantotenato de calcio contenido en la melaza de caña de azúcar es de 50 - 100 ppm y en melaza de remolacha azucarera es de 54 ppm

La nicotinamida, la riboflavina y la tiamina se encuentran en suficiente cantidad, pero en ocasiones son adicionadas al medio (Beudeker *et al.*, 1989), la piridoxina y el ácido fólico están presentes en ambas melazas.

El incremento de minerales en melaza de remolacha azucarera es de cerca del 10 % respecto a la melaza de caña de azúcar, de los cuales el 80 % corresponden a compuestos de potasio y carbonato de sodio (Spencer y Spencer, 1997).

La composición aproximada de minerales de las melazas dependen del tipo de suelo y de la composición de los fertilizantes utilizados.

El precio de la melaza de caña de azúcar, a pesar de ser un producto importado de América, es competitivo con el de la melaza de remolacha azucarera.

Además de las melazas convencionales, el residuo de la sacarificación del almidón que se acumula después de la cristalización de la glucosa es también utilizado como sustrato de fermentación (Crueger y Crueger, 1993).

### **1.1. Prueba preliminar en medio NYDB a diferentes pH.**

Los estudios de la cepa *C. sake* (CPA-1) se han realizado con el medio de referencia NYDB. Este medio que tiene en su composición todos los nutrientes necesarios para su crecimiento (Janisiewicz *et al.*, 1992; Usall, 1995; Teixidó, 1997). Así pues, las pruebas de crecimiento en los diferentes medios se comparan con este medio, que sirve de referencia.

Con el objetivo de obtener los mejores resultados de crecimiento es necesario determinar entre otros parámetros el intervalo de pH dentro del cual crece la cepa *C. sake* (CPA-1). Tomando como referencia los resultados obtenidos por Teixidó (1997; 1998a), en que el pH ideal para el crecimiento del antagonista en medio NYDB es de 5, se realiza una prueba preliminar en este medio a diferentes pH. modificados con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, en función del pH deseado, siguiendo la metodología explicada en el apartado 7.1 del capítulo de Material y Métodos, siguiendo la metodología de crecimiento explicada en el apartado 14.2 del capítulo de materiales y métodos, a la temperatura considerada por Usall (1995) como la óptima de

crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio NYDB.

**Tabla 22: Influencia del pH en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio NYDB.**

pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO (a)
3,0	2,8	2,4E+08
4,0	4,4	4,4E+08
5,0	5,5	4,1E+08
6,0	5,8	3,7E+08
7,0	6,2	4,0E+08
8,0	6,4	2,8E+08
9,0	7,9	6,5E+06
10,0	8,0	6,1E+04

(a): expresado en ufc/ml

Según los resultados obtenidos en la Tabla 22 se puede observar que en el rango de pH de 4 a 8 se obtienen los mejores valores de crecimiento con una concentración alrededor de  $3,6 \cdot 10^8$  ufc/ml. A pH 3 el antagonista presenta un crecimiento más bajo ( $2,4 \cdot 10^8$  ufc/ml), produciéndose un notorio descenso a partir de pH 9 ( $6,5 \cdot 10^6$  ufc/ml).

A partir de estos resultados se considera oportuno que todas las pruebas de crecimiento del antagonista se realicen en los diferentes medios de cultivo en un intervalo de pH entre 4 y 8.

## 1.2. Crecimiento en levadura de cerveza.

Todos los crecimientos y siembras en los diferentes medios simples se realizan siguiendo la metodología del apartado 14.2 del capítulo de Materiales y Métodos, tomando como parámetro de comparación el crecimiento obtenido al mismo tiempo en la misma prueba en medio NYDB, así la primera prueba es con levadura de cerveza a diferentes concentraciones siguiendo la metodología del apartado 4.1 del capítulo de Material y Métodos.

Analizando los resultados (Tabla 23), el crecimiento mejora a medida que aumenta la concentración de la levadura de cerveza en el medio hasta el 40 %, punto en que comienza a disminuir; al 10 % el crecimiento es menor que el obtenido en NYDB. A partir de una concentración del 40 % lo supera con una relación medio/NYDB igual a 1,02, mientras que a partir del 60 % disminuye (relación medio/NYDB = 0,72). A partir de esta última concentración

de levadura de cerveza en el medio comienza a inhibir el crecimiento del antagonista, pudiendo ser una de las causas el bajo pH del medio de valor 3,9, y que aumenta ligeramente al final del crecimiento.

Tabla 23: Influencia de la concentración de levadura de cerveza en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN (p/v)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
10 %	4,0	5,6	2,9E+08	1,8E+08	0,62
40 %	4,2	4,0	2,9E+08	2,9E+08	1,02
60 %	3,9	4,1	2,9E+08	2,1E+08	0,72

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

### 1.3. Crecimiento en bagazo de cebada.

El bagazo de cebada es la segunda materia prima como medio de cultivo donde se realizan pruebas de crecimiento dada su composición rica en nutrientes (apartado 6.3 del capítulo de Material y Métodos). No obstante, presenta el inconveniente de ser insoluble en el agua determinando que el método de preparación sea diferente: se extraen sus componentes nutritivos por infusión o cocción siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.2 del capítulo de Material y Métodos. Se preparan medios de cultivo a diferentes concentraciones y se somete a crecimiento el antagonista.

Tabla N° 24: Influencia de la concentración del bagazo de cebada en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(p/v)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
10% cocción	5,5	6,6	1,5E+08	3,5E+07	0,23
10% infusión	4,7	6,2	1,5E+08	3,4E+07	0,22
20% cocción	4,9	6,5	1,5E+08	6,8E+07	0,45
20% infusión	4,7	6,3	1,5E+08	4,5E+07	0,30

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

Todas las composiciones ensayadas (Tabla 24) el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es inferior al del NYDB, aumentando a medida que la concentración del bagazo en el medio es mayor.

Así el crecimiento es mayor en el caso del medio al 20 % de bagazo, preparado mediante cocción





con una relación medio/NYDB igual a 0,45 y el pH del medio una vez crecido el antagonista.

Estableciendo comparaciones de crecimiento según el método de preparación, se observa que mejora ligeramente en la cocción, por lo que se deduce que al someter el bagazo a un proceso de ebullición, donde la temperatura es más elevada que la infusión, existe una mayor extracción de nutrientes.

Otro punto a considerar en este medio de crecimiento es la dificultad de la preparación tanto por cocción como por infusión, siendo tanto más complicada cuanto mayor sea la concentración del bagazo de cebada en el medio.

#### 1.4. Crecimiento en germen de cebada.

Al igual que el bagazo de cebada, el germen de cebada es un medio rico en nutrientes (apartado 6.4 del capítulo de Material y Métodos), por ser insoluble en agua se prepara por infusión y cocción siguiendo la metodología del apartado 4.3 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 25: Influencia de la concentración del germen de cebada en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(p/v)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
10% cocción	5,3	6,4	3,5E+08	5,8E+08	1,7
10% infusión	5,3	7,6	3,5E+08	6,5E+08	1,9
20% cocción	5,4	7,7	3,5E+08	7,5E+08	2,2
20% infusión	5,3	7,5	3,5E+08	1,1E+09	3,1

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

Según los resultados de la Tabla 25, el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) aumenta a medida que se incrementa la concentración del germen de cebada en el medio, como bien se observa en el caso del germen de cebada al 20 % por infusión, con una relación medio/NYDB igual a 3,1.

Comparando los resultados obtenidos siguiendo el método de elaboración, hay un mejor crecimiento en el medio germen de cebada preparado mediante infusión a diferentes concentraciones, contrariamente a lo sucedido en el medio bagazo de cebada donde había mejor crecimiento en cocción. Se puede pensar que elevadas temperaturas de ebullición degradan algunos componentes nutricionales del germen de cebada.

Relacionando este medio con el bagazo de cebada en todas las concentraciones y métodos de preparación hay un mayor crecimiento en el medio germen de cebada, pero se tiene el

inconveniente de una elaboración más compleja.

El germen de cebada es muy higroscópico (Briggs *et al.*, 1991); absorbe grandes cantidades de agua durante su preparación y para la extracción del líquido se debe prensar, siendo una filtración complicada, por lo que no se pueden preparar medios con una mayor concentración de germen de cebada.

Analizando la variación del pH, se observa que su pH inicial es mayor relacionado con los medios de levadura de cerveza y bagazo de cebada. Inicialmente está alrededor de 6 y después de crecido el antagonista tiene la misma tendencia a aumentar.

## 1.5. Crecimiento en concentrado de zumo de manzana.

### 1.5.1. En medio simple de concentrado de zumo de manzana.

Otro medio alternativo es el concentrado de zumo de manzana que se prepara a diferentes concentraciones. Por tener un pH inferior a 4 se modifica a valores cercanos a 5 con hidróxido de sodio, según la metodología detallada en el apartado 4.4 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 26: Influencia de la concentración del concentrado de zumo de manzana en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH INICIAL	pH MOD.	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
10 g/l	3,8	5,2	3,4	1,2E+08	3,5E+07	0,29
20 g/l	3,4	5,2	3,3	1,2E+08	3,6E+07	0,30
40 g/l	3,2	5,2	3,2	1,2E+08	9,5E+07	0,79
100 g/l	3,6	5,0	3,5	1,2E+08	7,3E+07	0,61

pH MOD.: pH del medio que se modifica con una disolución de NaOH.

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

El crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) aumenta (Tabla 26) a medida que se incrementa la concentración del concentrado de zumo de manzana; la composición de 40 g/l es la que presenta el mejor crecimiento (relación medio/NYDB = 0,79), sin embargo es inferior al del NYDB. Concentraciones de 100 g/l de zumo de manzana inhiben al antagonista y comienzan a disminuir su crecimiento (relación medio/NYDB = 0,61). Se deduce que una de las causas puede ser el pH bajo del medio, que a pesar de ser modificado con una disolución de hidróxido de sodio para llegar al pH más adecuado para el antagonista, no mejora el crecimiento.

Al final el pH tiene una tendencia contraria a la de los medios de levadura de cerveza, bagazo de cebada y germen de cebada, es decir, disminuye. Puede deducirse que presenta una deficiencia de fuentes de nitrógeno, ya que son los metabolitos finales resultantes de la oxidación de las fuentes de carbono del medio mencionado por Ward (1989) (variación del pH), los que modifican el pH a ácido.

### 1.5.2. En concentrado de zumo de manzana enriquecido con sulfato de amonio y fosfato hidrógeno de potasio.

El medio concentrado de zumo de manzana tiene deficiencia de fuentes de nitrógeno y de minerales en su composición (apartado 6.5 del capítulo de Material y Métodos), que se confirman con los crecimientos alcanzados que se obtuvieron en los anteriores resultados. Para enriquecer el medio y mejorar el crecimiento se realizan pruebas en medios suplementados con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y fosfato hidrógeno de potasio como fuente de fósforo y potasio, siguiendo la metodología explicada en el apartado 6.1 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 27: Influencia del enriquecimiento del medio concentrado de zumo de manzana (C.z.m.) con una fuente de nitrógeno y potasio, en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
C.z.m.20 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4 g/l	3,9	4,1	1,1E+08	3,5E+07	0,34
C.z.m.20 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4 g/l +KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .0,8 g/l	3,9	4,0	1,1E+08	4,3E+07	0,41

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): C.z.m.: concentrado de zumo de manzana.

Analizando la Tabla 27 se observa que a pesar de haber enriquecido el medio, no aumenta el crecimiento: la relación medio/NYDB (igual a 0,30) obtenida en el medio concentrado de zumo de manzana 20 g/l es ligeramente inferior al ratio correspondiente al medio concentrado de zumo de manzana 20 g/l con sulfato de amonio 4 g/l y con fosfato hidrógeno de potasio 0,8 g/l (igual a 0,34).

En esta experiencia no se modifica el pH por estar cercano a 4. El pH final del medio tiene igual tendencia que los anteriores medios de levadura de cerveza, bagazo de cebada y germen de cebada, pero diferente al medio concentrado de zumo de manzana simple. Este cambio en la variación del pH al final del crecimiento, aunque no varía mucho, es consecuencia de los metabolitos

producidos por las fuentes de nitrógeno incorporadas, se ratifica una vez más que una de las causas para el bajo crecimiento puede ser el bajo pH inicial del medio.

## 1.6. Crecimiento en derivados lácteos.

### 1.6.1. En lactosuero.

Como se explicó en el apartado 4.5 del capítulo de Material y Métodos, inicialmente se filtra el lactosuero para eliminar las impurezas sólidas y se prepara el medio de cultivo a diferentes concentraciones. Se observa que al aumentar la concentración de lactosuero en el medio una vez esterilizado, crece la precipitación de las albúminas y globulinas presentes en el suero. A elevadas concentraciones (80 %, 100 % de lactosuero), después de 39 h de crecimiento, todo el medio incluido el microorganismo precipita y se insolubiliza, formándose grumos difíciles de sembrar.

Tabla 28: Influencia de la concentración del lactosuero(L) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(v/v)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
10%	6,4	7,6	1,4E+08	5,8E+06	0,04
20%	6,3	7,8	1,4E+08	2,4E+07	0,17
30%	6,3	7,4	2,0E+08	3,0E+07	0,15
40%	6,0	7,6	1,4E+08	3,4E+07	0,25
60%	5,9	7,8	2,0E+08	6,8E+07	0,34
80%	6,0	7,9	2,0E+08	3,6E+08	0,15

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

Se realiza la experiencia en dos pruebas de crecimiento: la primera con medios de lactosuero en concentraciones al 10, 20 y 40 %, y la segunda con medios al 30, 60 y 80 %. Después de obtener y resumir los resultados (Tabla 28), se observa que al elevar la concentración de lactosuero en el medio, el crecimiento es mayor. En lactosuero 60 % se obtiene el mejor crecimiento (relación medio/NYDB = 0,34), mientras que en lactosuero 80 % disminuye, por lo que comienza a inhibir el crecimiento del antagonista, a la vez que aumenta la concentración del precipitado insoluble. Comparado con el NYDB en todas las concentraciones tiene un crecimiento más bajo.

El pH inicial del medio está alrededor de 6 y al igual que el de germen de cebada, es mayor que el de los otros medios experimentados. Asimismo al final del crecimiento aumenta, de forma análoga

a los medios: levadura de cerveza, bagazo de cebada y germen de cebada. Se puede considerar que la variación del pH es debida a los metabolitos básicos producidos por la asimilación de la levadura de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio, hecho descrito en el metabolismo de las levaduras por Reed y Nagodawithana (1991) y por Jennings (1996).

### 1.6.2. Lactosuero enriquecido con sulfato de amonio y fosfato hidrógeno de potasio.

En base a la bibliografía consultada, el lactosuero es una de las mejores alternativas como medio de cultivo económico para el crecimiento de microorganismos como: *Saccharomyces fragilis* (Madrid, 1981), *Kluyveromyces fragilis* (Szczodrak et al., 1997). Sin embargo su composición nutritiva es deficiente en fuentes de carbono adicionales a la lactosa, nitrógeno y potasio, y la cepa *C. sake* (CPA-1) no asimila la lactosa (test identificación de levaduras ID 32 C de la casa BioMérieux S.A., Francia). Estos argumentos podrían ser la causa de los bajos crecimientos alcanzados en el medio lactosuero simple.

Tomando como referencia los resultados obtenidos por Usall (1995), en donde llega a determinar los requerimientos nutricionales de nitrógeno y carbono de la cepa *C. sake* (CPA-1), se procede a enriquecer el medio simple de lactosuero con los mencionados nutrientes para determinar si mejoran el crecimiento del antagonista.

Se preparan medios enriquecidos con una fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) y una fuente de fósforo y potasio (fosfato hidrógeno de potasio) según la metodología del apartado 6.2 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 29: Influencia del enriquecimiento del medio lactosuero(L) con fuentes de nitrógeno y potasio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIO	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
L.10%+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2g/l+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4g/l	5,9	6,5	1,4E+08	4,7E+06	0,03
L.20%+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 g/l	6,3	6,9	1,4E+08	1,4E+07	0,10
L.20%+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2g/l+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4g/l	6,0	7.3	1,4E+08	1,3E+07	0,10

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): L.: lactosuero.

Al enriquecer el medio con una fuente de nitrógeno o fuentes de nitrógeno y potasio, se observa que no mejora el crecimiento del antagonista, sino que disminuye ligeramente. El medio enriquecido con sulfato de amonio 2 g/l y fosfato de potasio 0,4 g/l presenta un crecimiento más bajo (4,7.10<sup>6</sup> ufc/ml) que el medio simple de lactosuero al 10 % (5,8.10<sup>6</sup> ufc/ml) (Tabla 29).

Resultados parecidos se observan en el medio de lactosuero al 20 %, concluyéndose que las fuentes de nitrógeno, fósforo y potasio utilizadas no han mejorado el crecimiento de la cepa (CPA-1) de *C. sake*. El pH de los medios no varía en relación al de los medios simples a pesar de la presencia de una fuente de nitrógeno, y al final del crecimiento aumenta.

El crecimiento del antagonista en los medios de lactosuero es más bajo que en los medios antes experimentados y que en NYDB.

### 1.6.3. En lactosuero enriquecido con glucosa como fuente de carbono.

Una vez analizados los resultados de los crecimientos obtenidos en el lactosuero enriquecido con sulfato de amonio y fosfato hidrógeno de potasio, se constata que el suplemento con fuentes de sales minerales y de nitrógeno no mejoran el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). Por consiguiente, se estudia como segunda alternativa el suplementar el medio con una fuente de carbono, sabiendo que la cepa *C. sake* (CPA-1) no asimila la lactosa (test identificación de levaduras ID 32 C de la casa BioMérieux S.A., Francia) y que este medio es deficiente en otras fuentes de carbono adicionales a la lactosa.

Se preparan medios de lactosuero enriquecidos con glucosa siguiendo la metodología explicada en el apartado 6.3 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 30: Influencia del enriquecimiento del lactosuero (L) con glucosa como fuentes de carbono en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
L. 40%+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 1%	6,0	4,6	2,40E+08	2,5E+08	1,07
L. 40%+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 1,5%	5,9	4,7	2,40E+08	2,6E+08	1,09
L. 40%+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2%	6,1	4,2	2,40E+08	3,3E+08	1,38
L. 60%+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2%	6,0	4,6	2,40E+08	3,1E+08	1,27
L. 60%+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 1%	6,0	4,3	2,40E+08	4,5E+08	1,88

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): L.: lactosuero, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>: glucosa

La Tabla 30 indica que el suplemento del medio lactosuero con glucosa mejora notoriamente el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1); el medio lactosuero 60 % con glucosa 1 % tiene el mayor crecimiento con una relación medio/NYDB igual a 1,88, valor superior al correspondiente al medio lactosuero 60 % simple (igual a 0,34).

En el medio lactosuero 60 % con glucosa 2 % empieza a disminuir, con relación medio/NYDB igual a 1,27. Para el medio lactosuero 40 % con glucosa 1 % (relación medio/NYDB = 1,07) el porcentaje de glucosa es insuficiente, presentando un crecimiento menor que el medio lactosuero 40 % con glucosa 2 % (relación medio/NYDB = 1,38). Por lo tanto, la mejor concentración de glucosa para un medio de lactosuero al 60 % es 1 % de glucosa, y para el medio lactosuero al 40 % es 2 % de glucosa.

Este fenómeno puede deberse a que cuando uno de los componentes del medio sobrepasa la concentración óptima ésta comienza a ser no adecuada para el máximo crecimiento del microorganismo.

En estos medios se constata además una mayor precipitación de las albúminas y globulinas presentes en el lactosuero.

Considerando la referencia bibliográfica en la cual se explica que el lactosuero presenta deficiencias en fuentes de carbono adicionales a la lactosa y según el test ATB 32C por el que la cepa *C. sake* (CPA-1) no asimila la lactosa (test identificación de levaduras ID 32 C de la casa BioMérieux S.A., Francia), concluimos que la suplementación de glucosa como fuente de carbono mejora el crecimiento. Es decir, el medio necesita una fuente de carbono adicional, que en nuestro caso corresponde al 1 % de glucosa en el medio de lactosuero al 60 %.

Analizando la variación del pH se observa que al final del crecimiento del antagonista, el pH disminuye, de un valor aproximado de 6 a 4,3, hecho contrario a lo que sucedía en el medio lactosuero simple. La explicación podría radicar en la producción de metabolitos ácidos por parte de la levadura, producto de la asimilación de la glucosa.

#### **1.6.4. En derivado láctico.**

Se realizan pruebas de crecimiento en un subproducto láctico al que se le asigna el nombre de “derivado láctico” por ser resultado de la evaporación del lactosuero al vacío. Tiene los mismos nutrientes que el lactosuero, pero en una mayor concentración y otros adicionales difíciles de cuantificar, producto del tratamiento a elevadas temperaturas al que es sometido (principalmente galactosa, glucosa y aminoácidos resultantes de la hidrólisis de la lactosa y las proteínas).

Se preparan medios de cultivo a diferentes concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.6 del capítulo de Material y Métodos.

Inicialmente se lleva a cabo una prueba de crecimiento en un medio con una concentración del 40 y 60 %, y en base a los resultados obtenidos se realiza otra prueba de crecimiento en medio con una concentración del 20 y 80 %.

El análisis del resumen de los resultados (Tabla 31) permite observar un efecto contrario a lo que sucedía en el medio de lactosuero, es decir el crecimiento disminuye a medida que aumenta la concentración de derivado láctico. Así pues, en medio derivado láctico 20 % hay un mejor crecimiento (relación medio/NYDB = 1,67) que en el medio derivado láctico 80 % donde éste disminuye notoriamente relación medio/NYDB igual a 0,001.

Tabla 31: Influencia de la concentración del derivado láctico en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
20 %	5,6	7,7	2,4E+08	4,0E+08	1,67
40 %	5,4	6,2	3,0E+08	3,0E+08	1,00
60 %	5,3	5,2	3,0E+08	2,9E+07	0,10
80 %	5,5	5,2	2,4E+08	3,3E+05	0,001

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

Al ser el derivado láctico un producto de la concentración del lactosuero, presenta en general un mejor crecimiento frente al lactosuero. Pero en concentraciones superiores al 20 % disminuye el crecimiento, pudiendo ser la causa las elevadas concentraciones de lactosa y otros productos. Estos actúan inhibiendo el crecimiento del antagonista.

El pH del medio después del crecimiento del antagonista aumenta al igual que en los medios levadura de cerveza, bagazo de cebada, germen de cebada y lactosuero.

#### 1.6.5. En derivado láctico enriquecido con glucosa como fuente de carbono.

Como en el caso del lactosuero, se suplementa el medio de derivado láctico con glucosa como fuente de carbono (apartado 6.4 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 32: Influencia del enriquecimiento del derivado láctico (D.l) con glucosa como fuente de carbono en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(p/v)(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
D.l. 40 %+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 1 %	5.4	5,1	3,0E+08	2,9E+08	0,97
D.l. 40 %+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 1,5 %	5.4	5,1	3,0E+08	1,2E+08	0.42
D.l. 60 %+ C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2 %	5,3	5,1	3,0E+08	6,5E+07	0,22

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): D.l.: derivado láctico, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>: glucosa.



Según los resultados (Tabla 32), a diferencia de lo que sucedía con el lactosuero, la suplementación del derivado láctico con glucosa disminuye el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). Se observa un mejor crecimiento en el medio simple respecto al medio suplementado con glucosa: en el derivado láctico 20 % la relación medio/NYDB es igual a 1,67, mientras que en derivado láctico 40 % con glucosa 1 % la relación medio/NYDB es igual a 0,97. Asimismo, al aumentar la concentración de derivado láctico y glucosa comienza a disminuir el crecimiento del antagonista, como se demuestra en el medio derivado láctico 60 % con glucosa 1,5 % y relación medio/NYDB igual a 0,42.

Contrariamente a los otros medios de crecimiento, el pH del medio no varía mucho, dándose una pequeña disminución de 5,4 a 5,1.

En conclusión, el medio de derivado láctico no necesita un suplemento de carbono para mejorar el crecimiento del microorganismo antagonista, por tener en su composición suficientes fuentes de carbono y nitrógeno, resultantes de la hidrólisis de la lactosa y de proteínas originadas por el tratamiento del medio a elevadas temperaturas (Madrid, 1981).

Comparando los medios de lactosuero y derivado láctico enriquecidos con glucosa, se concluye que se obtienen mejores resultados de crecimiento en el medio de lactosuero con glucosa.

## 1.7. Crecimiento en melaza de caña de azúcar.

La melaza de caña de azúcar es uno de los medios de crecimiento de microorganismos más utilizado a nivel industrial por su composición rica y casi completa en nutrientes, sobre todo los necesarios para el crecimiento de las levaduras (apartado 6.8 del capítulo de Material y Métodos).

Se realizan dos experiencias: primero se preparan medios de cultivo a concentraciones de 5, 10, 20, 200 y 630 g/l (apartado 4.7 del capítulo de Material y Métodos), en base a los resultados obtenidos se realiza otra prueba con concentraciones de 30, 40, 50 y 60 g/l hasta alcanzar la concentración óptima con el mejor crecimiento.

Según los resultados de la Tabla 33, a medida que se incrementa la concentración de la melaza en el medio, aumenta el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) hasta una concentración de 50 g/l que tiene el mejor crecimiento (relación medio/NYDB igual a 2,50). En concentraciones mayores comienza a reducirse, como en melaza 60 g/l con una relación medio/NYDB de 2,27 y continúa reduciéndose hasta que a elevadas concentraciones, del orden de 630 g/l, el crecimiento es muy bajo. Es decir, concentraciones por encima de 50 g/l de melaza empiezan a inhibir el crecimiento del microorganismo.

Tabla 33: Influencia de la concentración de la melaza de caña de azúcar en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
5 g/l	5,2	5,1	1,7E+08	9,4E+06	0,06
10 g/l	5,1	4,9	1,7E+08	2,3E+07	0,14
20 g/l	5,0	4,9	1,7E+08	4,5E+07	0,26
30 g/l	5,0	4,8	1,1E+08	1,4E+08	1,27
40 g/l	4,9	4,6	1,1E+08	2,0E+08	1,82
50 g/l	4,9	4,6	1,1E+08	2,7E+08	2,50
60 g/l	4,7	4,5	1,1E+08	2,5E+08	2,27
200 g/l	4,8	4,5	1,7E+08	1,5E+08	0,88
630 g/l	4,7	4,6	1,7E+08	9,9E+05	0,006

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

El medio de melaza de caña de azúcar 50 g/l es uno de los mejores en cuanto al crecimiento obtenido en medios simples.

En relación al pH, el comportamiento es similar al de los medios concentrado de zumo de manzana, lactosuero con glucosa, derivado láctico con glucosa: al aumentar la concentración de la melaza en el medio, éste disminuye, con valores alrededor de 4,9 y algo inferiores al final del crecimiento del antagonista.

Haciendo un resumen de las pruebas realizadas hasta ahora, el mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se obtiene en medio germen de cebada 20 %, pero como se explicó, existe el inconveniente de la laboriosidad de su preparación y de la necesidad de altas cantidades de germen de cebada para preparar el medio: 20 g de germen de cebada por cada 100 ml de medio.

El medio de melaza de caña de azúcar es otro de los medios simples con mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), siendo un medio de fácil preparación y que requiere bajas cantidades: 5 g de melaza de caña de azúcar por cada 100 ml de medio.

## 1.8. Crecimiento en melaza de remolacha azucarera.

La melaza de remolacha azucarera, de composición semejante a la melaza de caña de azúcar, es otra de las materias primas más usadas como medio de cultivo para el crecimiento de levaduras (Reed y Nagodawithana, 1991; Beudeker *et al.*, 1989; Imrie, 1969).

De igual modo que en el medio de melaza de caña de azúcar, se preparan medios a diferentes concentraciones (apartado 4.8 del capítulo de Material y Métodos) para determinar la concentración límite con mejor crecimiento.

En base a los resultados obtenidos (Tabla 34), se constata que el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) aumenta a medida que es mayor la concentración de la melaza de remolacha azucarera, alcanzándose el mejor crecimiento en el medio 50 g/l (relación medio/NYDB = 2,05). A partir de este valor comienza a decrecer, tal y como muestra el medio melaza de remolacha azucarera 100 g/l con una relación medio/NYDB igual a 0,88.

Tabla 34: influencia de la concentración de la melaza de remolacha azucarera en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB.	C.MEDIO	(1)
30g/l	6,7	6,5	2,5E+08	3,3E+08	1,32
40g/l	7,1	6,2	2,5E+08	4,2E+08	1,68
50g/l	7,8	5,1	2,5E+08	5,0E+08	2,05
80g/l	8,0	5,5	2,5E+08	2,8E+08	1,12
100g/l	8,0	5,7	2,5E+08	2,2E+08	0,88

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

El medio melaza de remolacha azucarera es otro medio simple en el cual se consigue un buen crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Analizando el pH, antes del crecimiento del antagonista éste aumenta conforme aumenta la concentración de la melaza en el medio, con valores cercanos a 8; y después del crecimiento disminuye a valores alrededor de 5,1, como en los medios concentrado de zumo de manzana, lactosuero con glucosa, derivado láctico con glucosa y melaza de caña de azúcar. Puede deducirse que el metabolito que determina este cambio es producto de la asimilación de las fuentes de carbono (Ward, 1989).

## 2. Crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medios combinados.

Una vez realizadas las pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en los diferentes medios simples y analizada su composición y resultados, se observa que cada uno presenta deficiencias nutritivas que influyen en el crecimiento. El suplemento mediante la combinación entre medios en función de sus carencias, mejora su composición y por tanto el crecimiento del microorganismo antagonista. Por consiguiente, el objetivo de esta segunda parte es realizar pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medios simples combinados en distintas concentraciones.

### 2.1. Medio combinado de bagazo de cebada con otros medios.

Según los resultados del apartado 1.3 de este capítulo se obtienen bajos crecimientos de la cepa *C. sake* (CPA-1). Se sabe además, que al aumentar la concentración del bagazo de cebada en el medio aumenta la dificultad del prensado para extraer el líquido.

Analizando su composición nutritiva, la fuente de carbono se encuentra en forma de polisacáridos como almidón, dextrinas y maltosa, difíciles de ser asimilados por el microorganismo. Así pues, se suplementa con levadura de cerveza la carencia de fuentes de carbono y nitrógeno.

Se preparan medios de bagazo de cebada por cocción y con levadura de cerveza, a diferentes concentraciones (apartado 5.1 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 35: Influencia de la combinación del medio de bagazo de cebada (B.c.) con levadura de cerveza (L.c.) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(p/v)(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
B.c. 10 %+L.c. 5 %	4,7	5,2	1,7E+08	7,4E+07	0,43
B.c. 20 %+L.c. 10 %	4,8	5,2	2,5E+08	2,7E+08	1,07

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): B.c.: bagazo de cebada, L.c.: levadura de cerveza.

A partir de los resultados de la Tabla 35 se observa que el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es mayor cuanto mayor es la concentración de los componentes del medio combinado: el medio de bagazo de cebada 20 % con levadura de cerveza 10 % (relación medio/NYDB = 1,07) presenta el doble de crecimiento que el medio simple de bagazo de cebada 20 % (relación medio/NYDB = 0,45).

En definitiva, la combinación del bagazo de cebada con levadura de cerveza mejora el crecimiento del antagonista, siendo éste ligeramente superior al del NYDB. A su vez, confirma la aportación por parte de la levadura de cerveza, rica en nutrientes, de una fuente de carbono fácil de asimilar por el antagonista.

Analizando la variación del pH, tras el crecimiento del antagonista tiene lugar un aumento del pH inicial del medio (pasa de valores cercanos a 4,8 a valores cercanos a 5,2), semejante a lo que sucede en los medios simples de levadura de cerveza, bagazo de cebada, germen de cebada, lactosuero y derivado láctico.

## 2.2. Medio de germen de cebada combinado con otros medios simples.

El segundo medio simple que se experimenta en combinación con otros medios simples es el germen de cebada, en el cual se obtuvieron buenos resultados de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). El análisis de la composición nutritiva del medio muestra que es rico en fuentes de nitrógeno, carbono como azúcares simples y minerales.

Se ve la posibilidad de mejorar aún más el crecimiento en este medio mediante la combinación con levadura de cerveza que es otro medio rico en nutrientes, preparando medios de germen de cebada combinados con levadura de cerveza (apartado 5.2 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 36: Influencia de la combinación del medio de germen de cebada (G.c.) con levadura de cerveza (L.c.) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(p/v)(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
G.c. 10 %+L.c. 10 %	4,8	7,1	2,4E+08	5,0E+08	2,00
G.c. 20 %+L.c. 10 %	4,3	6,7	2,4E+08	6,9E+08	2,89
G.c. 10 %+L.c. 40 %	5,0	5,0	2,4E+08	3,1E+08	1,30
G.c. 20 %+L.c. 40 %	4,4	5,1	2,4E+08	2,9E+08	1,20

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): G.c.: germen de cebada, L.c.: levadura de cerveza.

Al aumentar la concentración del germen de cebada en el medio combinado que tiene una baja concentración de levadura de cerveza aumenta el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) (Tabla 36). Dicha evolución se da hasta alcanzar una alta concentración de levadura de cerveza en el medio combinado, por la cual disminuye el crecimiento: en el medio germen de cebada 20 % con levadura de cerveza 40 % y relación medio/NYDB = 1,2 el crecimiento es menor respecto al

medio germen de cebada 20 % con levadura de cerveza 10 % y relación medio/NYDB = 2,89. En consecuencia, altas concentraciones de levadura de cerveza no son adecuadas para el crecimiento del microorganismo antagonista.

La comparación entre el medio simple y el medio combinado de germen de cebada pone de manifiesto un mejor crecimiento en el medio simple de germen de cebada 20 %, con una relación medio/NYDB igual a 3,1. Se puede concluir que la combinación con otros medios simples no favorece el crecimiento del antagonista, pudiendo ser una de las causas el exceso de fuentes de nitrógeno, ya que tanto el germen de cebada como el extracto de levadura de cerveza son ricos en este componente.

El pH inicial del medio se encuentra alrededor de 4,6, después del crecimiento sigue la tendencia de los otros medios, es decir, que aumenta hasta valores cercanos a 6,0, ratificándose que se está metabolizando la fuente de nitrógeno al obtenerse metabolitos básicos que aumentan el pH final (Reed y Nagodawithana, 1991; Jennings, 1996).

### 2.3. Medio concentrado de zumo de manzana combinado con otros medios simples.

Teniendo en cuenta el bajo crecimiento obtenido en el medio concentrado zumo de manzana y dada su deficiencia de compuestos nitrogenados, se combina con dos medios ricos en fuentes de nitrógeno, como son la levadura de cerveza y el germen de cebada, con el objetivo de obtener un medio más rico y aumentar la población microbiana.

Tabla 37: Influencia de la combinación del medio concentrado de zumo de manzana (C.z.m) con levadura de cerveza (L.c.) y germen de cebada (G.c.) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
C.z.m. 25g/l+L.c. 5 %	5,1*	6,2	2,9E+08	3,0E+08	1,04
C.z.m. 20g/l+L.c. 10 %	4,0	6,3	2,9E+08	2,3E+08	0,79
C.z.m. 40g/l+L.c. 40 %	4,0	3,9	2,9E+08	2,1E+08	0,72
C.z.m. 60g/l+G.c. 10 %	4,5	4,1	3,5E+08	5,0E+08	1,45
C.z.m. 40g/l+G.c. 20 %	4,5	4,9	3,5E+08	6,0E+08	1,72

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): C.z.m.: concentrado de zumo de manzana, G.c.: germen de cebada, L.c.: levadura de cerveza.

(\*): el medio concentrado de zumo de manzana 25 g/l con levadura de cerveza 5 %, tiene un pH de 3,68 y se modifica a 5,14 con disolución de hidróxido de sodio 1 N (apartado 4.4 del capítulo de Material y Métodos).

Se realizan dos pruebas: primeramente en medios combinados de concentrado de zumo de manzana con levadura de cerveza y a continuación en medios combinados de concentrado de zumo de manzana con germen de cebada preparados siguiendo la metodología de los apartados 5.3 y 5.4 del capítulo de Material y Métodos.

Según la Tabla 37 en el caso de medio combinado de concentrado de zumo de manzana con levadura de cerveza, al aumentar la concentración de los dos componentes disminuye el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1): de una relación medio/NYDB igual a 1,04 en el medio concentrado de zumo de manzana 25 g/l con levadura de cerveza 5 %, decrece a una relación de 0,72 en el medio concentrado de zumo de manzana 40 g/l con levadura de cerveza 40 %.

El medio combinado de concentrado de zumo de manzana con germen de cebada presenta mejor crecimiento que el medio combinado de concentrado de zumo de manzana con levadura de cerveza. Así se verifica en el medio concentrado de zumo de manzana 40 g/l con germen de cebada 20 %, cuya relación medio/NYDB es igual a 1,72.

Comparando los medios compuestos con sus respectivos medios simples, se puede decir que el medio combinado concentrado de zumo de manzana con germen de cebada suscita un crecimiento mayor que el medio simple de concentrado zumo de manzana 40 g/l (relación medio/NYDB = 0,79), pero menor que el medio simple de germen de cebada 20 % (relación medio/NYDB = 3,1).

El crecimiento en el medio concentrado de zumo de manzana con levadura de cerveza es menor frente al del medio simple de levadura de cerveza al 40 % (relación medio/NYDB = 1,02) y casi igual al del medio simple de concentrado de zumo de manzana (relación medio/NYDB = 0,79).

La mejor combinación de las estudiadas es el concentrado de zumo de manzana con germen de cebada, el cual favorece el crecimiento del antagonista, pero de magnitud inferior al crecimiento en germen de cebada simple.

Después las pruebas de crecimiento realizadas en concentrado de zumo de manzana simple enriquecido con nutrientes y combinado con otros medios, se puede concluir que este medio es deficiente en los nutrientes necesarios para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). Por ello, al suplementarlo con germen de cebada, rico en fuentes de carbono y nitrógeno, mejora el crecimiento del microorganismo, pero sin llegar a los niveles de crecimiento obtenidos en otros medios simples como el germen de cebada y la levadura de cerveza.

El pH al final del crecimiento aumenta.

## 2.4. Medio lactosuero combinado con otros medios simples.

Con el fin de suplementar las deficiencias nutritivas de nitrógeno, carbono adicionales a las deficiencias de lactosa y potasio que presenta el lactosuero, se realizan tres experiencias de crecimiento en medios combinados: de lactosuero con levadura de cerveza como fuente de nitrógeno y minerales (apartado 5.5 del capítulo de Material y Métodos), de lactosuero con concentrado de zumo de manzana como fuente de carbono (apartado 5.6 del capítulo de Material y Métodos) y de lactosuero con germen de cebada como fuente de nitrógeno y minerales (apartado 5.7 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla N° 38: Influencia de la combinación del medio lactosuero (L.) con levadura de cerveza (L.c.), concentrado de zumo de manzana(C.z.m.) y germen de cebada (G.c.) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
L. 40 %(v/v) +L.c. 20 %(p/v)	4,6	5,5	2,87E+08	3,2E+08	1,10
L. 40 %(v/v) +L.c. 40 %(p/v)	4,3	4,7	2,87E+08	4,4E+08	1,55
L. 60 %(v/v) +L.c. 20 %(p/v)	4,7	5,9	2,87E+08	3,2E+08	1,12
L. 60 %(v/v) +L.c. 40 %(p/v)	4,5	5,1	2,87E+08	4,1E+08	1,43
L. 40 %(v/v) +C.z.m. 20g/l	4,8	4,4	2,85E+08	2,1E+08	0,73
L. 30 %(v/v) +C.z.m. 20g/l	4,5	4,2	2,85E+08	3,0E+08	1,05
L. 60 %(v/v) +C.z.m. 40g/l	4,6	4,3	2,85E+08	1,1E+08	0,39
L. 20 %(v/v) +G.c. 10 %(p/v)	5,3	7,7	3,47E+08	6,5E+08	1,88
L. 40 %(v/v) +G.c. 20 %(p/v)	5,5	7,8	3,47E+08	5,6E+08	1,63

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): L.: lactosuero, L.c.: levadura de cerveza, C.z.m.: concentrado de zumo de manzana, G.c.: germen de cebada.

De acuerdo con los resultados (Tabla 38), el medio combinado de lactosuero con germen de cebada posee el mejor crecimiento, como bien demuestra el medio lactosuero 20 % con germen de cebada 10 % y relación medio/NYDB igual a 1,88. En cambio, el medio con menor crecimiento es el combinado de lactosuero con concentrado de zumo de manzana, como se constata con el medio de lactosuero 60 % con concentrado de zumo de manzana 40 g/l y relación medio/NYDB igual a 0,39.



En el medio combinado de lactosuero con levadura de cerveza a diferentes concentraciones, el mejor crecimiento se obtiene en el medio lactosuero 40 % con levadura de cerveza 40 % y relación medio/NYDB igual a 1,55. A su vez, se observa que al aumentar la concentración de lactosuero en dicho medio comienza a disminuir el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

El estudio desde el punto de vista de medios simples y sus respectivos medios combinados, pone de manifiesto un mejor crecimiento en el medio combinado de lactosuero 20 % con germen de cebada 10 %, el cual aumenta en un exponente ( $6,5 \cdot 10^8$  ufc/ml) con relación al medio simple de lactosuero al 60 % ( $6,8 \cdot 10^7$  ufc/ml). A pesar de ser un buen crecimiento, éste es inferior al obtenido en medio simple de germen de cebada al 20 % (relación medio/NYDB = 3,1), por lo que se concluye que el germen de cebada suplementa con fuentes de nitrógeno y carbono al lactosuero.

El combinado de lactosuero con concentrado de zumo de manzana tiene mejor crecimiento en relación con el medio simple de concentrado de zumo de manzana 40 g/l (relación medio/NYDB igual a 0,79). Por lo tanto, el concentrado de zumo de manzana se suplementa con los nutrientes del lactosuero.

El medio combinado de lactosuero con levadura de cerveza también mejora el crecimiento en comparación con el medio simple de levadura de cerveza 40 % (relación medio/NYDB igual a 1,02). Por lo que la levadura de cerveza suplementa la deficiencia de fuentes de carbono y nitrógeno del lactosuero.

Después de todo lo expuesto se puede concluir que la combinación del lactosuero con otros medios simples mejora su composición nutritiva, siendo la mejor combinación el medio lactosuero con germen de cebada. El inconveniente es la dificultad de su preparación, pero como alternativa está el medio combinado de lactosuero con levadura de cerveza que tiene también buenos crecimientos, mientras que en el medio combinado de lactosuero con concentrado de zumo de manzana los crecimientos son bajos.

Asimismo se constata que la deficiencia de fuentes de carbono y de nitrógeno del medio lactosuero se suplementa con el germen de cebada y la levadura de cerveza.

Todos los medios presentan crecimientos superiores al de NYDB.

La variación del pH sigue la misma tendencia de los medios simples levadura de cerveza, bagazo de cebada, germen de cebada, lactosuero y derivado láctico: aumenta al final del crecimiento, con excepción del medio lactosuero con concentrado de zumo de manzana donde el pH final es menor que el inicial.

## 2.5. Medio melaza de caña de azúcar combinado con otros medios simples.

Uno de los mejores medios simples para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es la melaza de caña de azúcar en una concentración 50 g/l.

Con el fin de estudiar la posibilidad de mejorar este crecimiento, se realizan varias experiencias de medio de melaza de caña de azúcar en combinación con otros medios simples: levadura de cerveza, bagazo de cebada, germen de cebada, concentrado de zumo de manzana, lactosuero y derivado láctico a diferentes concentraciones (apartados 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 del capítulo de Material y Métodos).

Se somete a crecimiento el microorganismo antagonista bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que en anteriores experiencias.

Tras examinar el resumen de los resultados (Tabla 39) obtenidos en las diferentes pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), se comparan los mismos con cada uno de los mejores crecimientos en sus respectivos medios simples, pudiéndose destacar:

- El medio de melaza de caña de azúcar 10 g/l con levadura de cerveza 10 % tiene mejor crecimiento (relación medio/NYDB = 1,63) que el medio simple de levadura de cerveza 40 % (relación medio/NYDB = 1,02), pero menor que el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l (relación medio/NYDB = 1,82). Como resultado, la combinación de los dos medios influye ligeramente en el aumento del crecimiento del microorganismo antagonista.
- El medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con bagazo 20 % por cocción muestra un crecimiento levemente superior (relación medio/NYDB = 0,94) que el medio de bagazo de cebada 20 % por cocción (relación medio/NYDB = 0,45), pero inferior que el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l. Por lo tanto, la aportación nutritiva del medio bagazo de cebada con melaza de caña de azúcar no favorece el crecimiento del antagonista.
- El medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con germen de cebada 20 % presenta un crecimiento algo inferior (relación medio/NYDB = 2,86) al medio de germen de cebada 20 % por infusión (relación medio/NYDB = 3,1), pero superior al medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l. En este caso, la combinación favorece el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) frente al medio simple de melaza de caña de azúcar, en tanto que lo desfavorece frente al medio simple de germen de cebada.
- El medio de melaza de caña de azúcar 20 g/l con lactosuero 30 % tiene un crecimiento mucho más alto (relación medio/NYDB = 2,10) que cualquiera de los medios simples de lactosuero (lactosuero 40 % con relación medio/NYDB = 0,25) y que el medio simple de melaza de caña

de azúcar 40 g/l. Es otro caso donde la combinación de los dos medios simples mejora notoriamente las condiciones de crecimiento del antagonista.

**Tabla 39: Influencia de la combinación del medio melaza de caña de azúcar (M.c.) con levadura de cerveza (L.c.), bagazo de cebada (B.c.), germen de cebada (G.c.), concentrado de zumo de manzana (C.m.), lactosuero (L.) y derivado láctico (D.l.) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
M.c. 10 g/l+L.c. 10 % (p/v)	4,3	4,6	2,9E+08	4,7E+08	1,63
M.c. 40 g/l+L.c. 40 % (p/v)	4,2	4,3	2,9E+08	3,0E+08	1,04
M.c. 10 g/l+B.c. 10 % (p/v)	5,5	6,3	3,5E+08	7,7E+07	0,22
M.c. 40 g/l+B.c. 20 % (p/v)	5,4	6,5	3,5E+08	3,3E+08	0,94
M.c. 10 g/l+G.c. 10 % (p/v)	5,3	6,8	3,5E+08	7,7E+08	2,20
M.c. 40 g/l+G.c. 20 % (p/v)	5,2	6,3	3,5E+08	1,0E+09	2,86
M.c. 10 g/l+C.m. 20g/l(p/v)	4,2	3,6	3,5E+08	1,2E+08	0,35
M.c. 40 g/l+C.m. 40g/l(p/v)	4,3	3,7	3,5E+08	4,0E+08	1,14
M.c. 10 g/l+L. 40 % (v/v)	6,0	7,4	2,9E+08	3,3E+08	1,13
M.c. 20 g/l+L. 30 % (v/v)	5,3	7,1	2,9E+08	6,0E+08	2,10
M.c. 40 g/l+L. 40 % (v/v)	5,9	6,8	2,9E+08	3,4E+08	1,17
M.c. 60 g/l+L. 10 % (v/v)	6,3	7,3	2,9E+08	3,5E+08	1,21
M.c. 60 g/l+L. 40 % (v/v)	5,7	6,6	2,9E+08	5,5E+08	1,90
M.c. 10 g/l+D.l. 20 % (v/v)	5,6	6,9	2,4E+08	2,2E+08	0,92
M.c. 40 g/l+D.l. 20 % (v/v)	5,4	6,3	2,4E+08	1,8E+08	0,75
M.c. 10 g/l+D.l. 40 % (v/v)	5,5	5,9	2,4E+08	1,1E+08	0,46
M.c. 40 g/l+D.l. 40 % (v/v)	5,5	5,4	2,4E+08	1,2E+08	0,50

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): M.c.: melaza de caña de azúcar, L.c.: levadura de cerveza, B.c.: bagazo de cebada, G.c.: germen de cebada, C.m.: concentrado de zumo de manzana, L.: lactosuero, D.l.: derivado láctico.

- El medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con concentrado de zumo de manzana 40 g/l mejora también el crecimiento (relación medio/NYDB = 1,14) comparado con todos los medios simples de concentrado de zumo de manzana (con 40 g/l la relación medio/NYDB es 0,79), en cambio, disminuye respecto al medio simple de melaza de caña de azúcar 40 g/l. Nuevamente, la combinación de ambos medios mejora el crecimiento del antagonista en relación con el medio simple concentrado de zumo de manzana.
- El medio de melaza de caña de azúcar 10 g/l con derivado láctico 20 % ofrece un menor crecimiento (relación medio/NYDB = 0,92) que el medio simple de derivado láctico 20 % (relación medio/NYDB = 1,67) y que el medio simple de melaza de caña de azúcar. En consecuencia, se ratifica una vez más la disminución del crecimiento del antagonista en medios combinados o suplementados de derivado láctico con glucosa comparado con el medio simple.

De forma generalizada, la variación del pH de los diferentes medios combinados aumenta al final del crecimiento, con excepción del medio de melaza de caña de azúcar con concentrado de zumo de manzana donde el pH disminuye, y el medio de melaza de caña de azúcar con derivado láctico donde existe una mínima modificación del pH.

En conclusión, las mejores combinaciones de medios simples son:

- En primer lugar, el medio de melaza de caña de azúcar con germen de cebada, donde la deficiencia de fuentes de nitrógeno que tiene la melaza de caña de azúcar se suplementa con el germen de cebada rico en este nutriente.
- En segundo término, la melaza de caña de azúcar con lactosuero, donde la deficiencia de fuentes de nitrógeno de la melaza de caña de azúcar y de carbono del lactosuero se suplementan mutuamente.

Para finalizar, los crecimientos alcanzados en medios combinados son parecidos a los alcanzados en medios simples con mejor crecimiento, los cuales son: el germen de cebada y la melaza de caña de azúcar.

### **3. Mejora del medio de cultivo con mayor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

Una vez analizado el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en diferentes medios simples:

- Levadura de cerveza;
- Bagazo de cebada;
- Germen de cebada;

- Lactosuero;
- Derivado láctico;
- Concentrado de zumo de manzana;
- Melaza de caña de azúcar;
- Melaza de remolacha azucarera;

Y comparando con los crecimientos obtenidos en:

- Combinación de dos medios simples;
- Medios simples suplementados.

Se determina que los mejores crecimientos se consiguen en medios simples, siendo los más remarcables:

- Germen de cebada preparado por infusión;
- Melaza de caña de azúcar;
- Melaza de remolacha azucarera.

Los medios combinados de dos medios simples presentan crecimientos similares a algunos medios simples, e incluso inferiores. Desde el punto de vista económico-rentable, la mayor complejidad de preparación y el elevado precio no justificarían la utilización de medios combinados a nivel industrial.

El medio de germen de cebada presenta el inconveniente de su proceso de preparación, el cual requeriría una serie de equipos específicos para realizarlo a nivel industrial. Por esta razón, se descarta a pesar de tener un buen crecimiento (germen de cebada 20 % por infusión con relación medio/NYDB igual a 3,1).

Entre las mejores alternativas se halla el medio de melaza de caña de azúcar en el cual se obtienen muy buenos crecimientos (con 50 g/l la relación medio/NYDB = 2,5) y el medio de melaza de remolacha azucarera 50 g/l que tiene un crecimiento relativamente bueno (relación medio/NYDB = 2,05).

El objetivo de la siguiente parte experimental es realizar pruebas de suplementación del medio de melaza de caña de azúcar con varios nutrientes para mejorar el crecimiento del antagonista y lograr una mayor población microbiana.

### **3.1. Incorporación de nutrientes en el medio de melaza de caña de azúcar para determinar su influencia en el crecimiento del antagonista.**

Según Beudeker *et al.* (1989) y Reed y Nagodawithana, (1991), el medio de melaza de caña de azúcar presenta deficiencia de fuentes de nitrógeno, potasio y sales minerales necesarias para el crecimiento de microorganismos; asimismo tiene una composición rica en biotina pero escasa en el resto de vitaminas que pueden influir en el crecimiento de levaduras.

En base a los buenos crecimientos obtenidos en medios simples de melaza de caña de azúcar en concentraciones de 30, 40 y 50 g/l, ésta última con los mejores resultados, primeramente se realizan varias pruebas en estas concentraciones y con diferentes fuentes de nitrógeno.

#### **3.1.1. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar con urea.**

La urea es una de las fuentes de nitrógeno empleada para enriquecer el medio de melaza de caña de azúcar y es recomendada por Beudeker *et al.* (1989), Creger y Creger (1993) y Reed y Nagodawithana (1991) por dar buenos resultados, ser barata y de fácil utilización a nivel industrial.

En una primera experiencia de crecimiento con urea: se preparan medios de melaza en concentraciones de 30, 40 y 50 g/l cada una con urea en concentraciones de 1,2, 2,0, 4,0 y 6,0 g/l (apartado 6.5 del capítulo de Material y Métodos).

Analizando los resultados (Tabla 40) los mejores crecimientos se dan en los medios de melaza de caña de azúcar a concentraciones 30, 40 y 50 g/l con urea en una concentración de 1,2 g/l. Destaca el medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l, con una relación medio/NYDB igual a 3,79. Al aumentar las concentraciones de urea en cada uno de los medios disminuye el crecimiento: así en el medio de melaza 50 g/l con urea 6,0 g/l éste disminuye en dos exponentes, obteniéndose una relación medio/NYDB igual a 0,01. Se deduce por tanto, que altas concentraciones de urea llegan a inhibir el crecimiento del antagonista.

Relativo a la concentración de la melaza de caña de azúcar en el medio, a bajas concentraciones de 30 g/l y diferentes concentraciones de urea, se constatan crecimientos menores que en medios con mayor concentración de melaza (40 g/l) y diferentes concentraciones de urea. No obstante, a partir de 50 g/l de melaza el crecimiento nuevamente comienza a retraerse, es decir, que la concentración de ambos componentes puede aumentar hasta alcanzar un umbral de concentración por encima del cual se inhibe el crecimiento del antagonista.

**Tabla 40: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar (M.c.) con urea (U.) como fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
M.c. 30 g/l+U. 1,2 g/l(20mM)	4,7	5,4	1,4E+08	4,3E+08	3,05
M.c. 30 g/l+U. 4,0 g/l	4,8	5,3	1,4E+08	2,3E+08	1,65
M.c. 30 g/l+U. 6,0 g/l	5,0	5,4	1,4E+08	2,0E+06	0,01
M.c. 40g/l+U. 1,2g/l(20 mM)	4,8	5,3	1,4E+08	5,3E+08	3,79
M.c. 40 g/l+U. 2 g/l	5,0	5,7	1,4E+08	3,6E+08	2,55
M.c. 40 g/l+U. 4 g/l	5,0	5,6	1,4E+08	2,6E+08	1,85
M.c. 40 g/l+U. 6,0 g/l	4,9	5,2	1,4E+08	2,3E+06	0,02
M.c. 50 g/l+U. 1.2 g/l(20 mM)	5,6	5,0	1,4E+08	3,2E+08	2,30
M.c. 50 g/l+U. 2 g/l	5,0	5,7	1,4E+08	3,1E+08	2,21
M.c. 50 g/l+U. 4,0 g/l	5,0	5,8	1,4E+08	2,1E+08	1,50
M.c. 50 g/l+U. 6,0 g/l	5,0	5,4	1,4E+08	5,9E+06	0,01

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): M.c.: melaza de caña de azúcar, U.: urea.

A partir de los resultados anteriores se lleva a cabo otra experiencia con el de medio melaza de caña de azúcar a iguales concentraciones que las anteriores, pero con urea a concentraciones más bajas, del orden de 2,0, 1,2, 0,6 y 0,3 g/l.

El máximo crecimiento se produce en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, dada la relación medio/NYDB igual a 2,31 (Tabla 41). En el medio de melaza 40 g/l a concentraciones de urea mayores y menores al valor señalado anteriormente, disminuye el crecimiento, siendo en menor proporción para concentraciones inferiores (así en el medio de melaza 40 g/l con urea 0,6 g/l la relación medio/NYDB es igual a 1,82).

Referente al medio de melaza de caña de azúcar 30 g/l, el mejor crecimiento se obtiene con urea en concentración 0,6 g/l (relación medio/NYDB = 1,79) y en concentraciones de urea mayores y menores el crecimiento tiene la misma tendencia que en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l.

En medios con una concentración de 50 g/l de melaza de caña de azúcar con diferentes concentraciones de urea, el mejor crecimiento se da en melaza 50 g/l con urea 2 g/l, cuya relación

medio/NYDB es igual a 1,88. En las otras concentraciones los valores son menores, con tendencia similar a la melaza 40 g/l y melaza 30 g/l, es decir, la concentración de ambos componentes puede incrementarse hasta alcanzar una concentración por encima de la cual se inhibe el crecimiento del antagonista.

**Tabla 41: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar (M.c.) con urea (U.) a diferentes concentraciones en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
M.c.30 g/l	5,3	5,1	3,1E+08	2,2E+08	0,71
M.c.30 g/l+U. 2,0 g/l	5,3	6,9	3,1E+08	3,2E+08	1,03
M.c.30 g/l+U. 1,2 g/l (20 mM)	5,3	6,7	3,1E+08	4,2E+08	1,35
M.c.30 g/l+U. 0,6 g/l	5,3	6,6	3,1E+08	5,6E+08	1,79
M.c.30 g/l+U. 0,3 g/l	5,3	5,9	3,1E+08	5,2E+08	1,67
M.c.40 g/l	5,3	5,0	3,1E+08	2,8E+08	0,88
M.c.40 g/l+U. 2,0 g/l	5,3	6,9	3,1E+08	5,0E+08	1,59
M.c.40 g/l+U. 1,2 g/l (20 mM)	5,3	6,7	3,1E+08	6,8E+08	2,31
M.c.40 g/l+U. 0,6 g/l	5,3	6,2	3,1E+08	5,7E+08	1,82
M.c.40 g/l+U. 0,3 g/l	5,3	5,4	3,1E+08	5,3E+08	1,69
M.c.50 g/l	5,3	4,9	3,1E+08	3,2E+08	1,04
M.c.50 g/l+U. 2,0 g/l	5,3	6,9	3,1E+08	5,9E+08	1,88
M.c.50 g/l+U. 1,2 g/l (20 mM)	5,3	6,0	3,1E+08	4,7E+08	1,49
M.c.50 g/l+U. 0,6 g/l	5,3	5,9	3,1E+08	5,3E+08	1,69
M.c.50 g/l+U. 0,3 g/l	5,3	5,3	3,1E+08	5,5E+08	1,77

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y el medio que se está experimentando.

(a): M.c.: melaza de caña de azúcar, U.: urea.

De todo lo analizado se puede deducir que altas concentraciones de urea y melazas llegan a inhibir el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

En las dos experiencias, al final del crecimiento aumenta el pH de los medios de melaza con urea. Hecho ya constatado en los medios simples de levadura de cerveza, bagazo de cebada, germen de



cebada, lactosuero, derivado láctico y en los medios combinados, excepto en los medios combinados con concentrado de zumo de manzana. Por consiguiente, la variación del pH es distinta a la de los medios simples de melaza de caña de azúcar, en donde el pH disminuye debido a los metabolitos producidos por la asimilación de la urea (Reed y Nagodawithana, 1991; Jennings 1996).

En conclusión, se verifica que la concentración de 1,2 g/l de urea es la mejor para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar en concentración de 40 g/l.

### 3.1.2. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar con sulfato de amonio.

Una segunda fuente de nitrógeno es el sulfato de amonio, recomendado por Large (1986), Reed y Nagodawithana (1991), Janisiewicz *et al.* (1992) y Usall (1995).

Tabla 42: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar (M.c.) con sulfato de amonio y urea (U.) como fuentes de nitrógeno en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
M.c.30 g/l	4,6	4,1	1,1E+08	1,4E+08	1,27
M.c.30 g/l+U. 1,2 g/l (20 mM)	4,6	5,3	1,1E+08	3,3E+08	3,00
M.c.30 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l(20 mM)	4,7	3,8	1,1E+08	3,1E+08	2,81
M.c.30 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4,0 g/l	4,7	3,6	1,1E+08	3,0E+08	2,72
M.c.40 g/l	4,6	4,3	1,1E+08	2,0E+08	1,81
M.c.40 g/l+U. 1,2 g/l (20 mM)	4,6	5,2	1,1E+08	3,6E+08	3,27
M.c.40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l(20 mM)	4,8	3,6	1,1E+08	2,9E+08	2,64
M.c.40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4,0 g/l.	4,6	3,8	1,1E+08	3,1E+08	2,82
M.c.50 g/l	4,6	4,2	1,1E+08	2,3E+08	2,09
M.c.50 g/l+U.1,2 g/l (20 mM)	4,6	5,0	1,1E+08	3,5E+08	3,18
M.c.50 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l(20 mM)	4,8	3,9	1,1E+08	3,1E+08	2,81
M.c.50 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4,0 g/l	4,6	3,7	1,1E+08	3,0E+08	2,72

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y el medio que se está experimentando.

(a): M.c.: melaza de caña de azúcar, U.: urea.

Se llevan a cabo pruebas de crecimiento con dos concentraciones de sulfato de amonio: 2,65 g/l

(20 mM), establecida como la mejor para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio NYDB (Usall, 1995) y otra superior de 4,0 g/l, en medios de melaza a concentraciones de 30, 40 y 50 g/l. Posteriormente, se comparan con crecimientos en medios de melaza a las mismas concentraciones y urea a una concentración de 1,2 g/l, así como con melazas simples a iguales concentraciones (apartado 6.6 del capítulo de Material y Métodos).

Los resultados de la Tabla 42 revelan que no existe una gran variación en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) al aumentar la concentración de sulfato de amonio. De igual modo, en los medios de melaza de caña de azúcar en concentraciones de 30, 40 o 50 g/l con sulfato de amonio 2,65 g/l (20 mM) el crecimiento es menor que en medios de melaza de caña de azúcar a iguales concentraciones, pero con urea 1,2 g/l (20 mM) como fuente de nitrógeno.

El medio donde se obtiene el mejor crecimiento es el medio de melaza 40 g/l con sulfato de amonio 4,0 g/l (relación medio/NYDB = 2,82), con poca diferencia respecto a los medios de melaza 30 y 50 g/l con sulfato de amonio a las dos concentraciones experimentadas.

La comparación entre los medios simples a distintas concentraciones de melaza y sus respectivos medios enriquecidos con sulfato de amonio, pone de manifiesto una mejora del crecimiento en éstos últimos, aunque sea un poco inferior al obtenido en medios de melaza de caña de azúcar enriquecidos con urea como fuente de nitrógeno.

El pH al final del crecimiento sufre una disminución, al igual que en los medios simples de concentrado de zumo de manzana, melaza de caña de azúcar, melaza de remolacha azucarera y medios combinados con concentrado de zumo de manzana. En cambio, los medios simples de levadura de cerveza, germen de cebada, bagazo de cebada, lactosuero, derivado láctico y medio de melaza de caña de azúcar enriquecido con urea se caracterizan por un incremento del pH.

Entre las causas de la variación del pH se encuentran los metabolitos ácidos ( $\text{HSO}_4$ )<sup>1-</sup> producidos por la hidrólisis del sulfato de amonio al ser asimilado por la levadura (Reed y Nagodawhitana; 1991).

El análisis global de todos los crecimientos permite concluir que el enriquecimiento del medio de melaza con urea como fuente de nitrógeno favorece más el crecimiento que con sulfato de amonio.

### **3.1.3. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar y urea con vitaminas y sales minerales.**

Se estudia la posibilidad de favorecer más el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) mediante la incorporación de las referidas sustancias, ya indicadas por Usall (1995), quien obtuvo mejoras en medio NYDB. Las razones de dicho estudio son, por una parte, la constatación de la mejora del crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar al enriquecerlo con urea como

fuentes de nitrógeno, siendo la mejor combinación el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l. Y por otra, confirmar referencias bibliográficas (Beudeker *et al.*, 1989) según las cuales se expone la deficiencia de nutrientes en la melaza de caña de azúcar de fuentes de nitrógeno, fosfatos y sales minerales como zinc y magnesio y vitaminas.

Se realizan dos experiencias: en la primera se prepara medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l enriquecido con biotina o con manganeso y cobre o con biotina, manganeso y cobre (apartados 6.8, 6.9 y 6.10 del capítulo de Material y Métodos). En la segunda, el medio de melaza 50 g/l y urea 1,2 g/l se enriquece con los mismos nutrientes y a las mismas concentraciones (apartados 6.8, 6.9 y 6.10 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 43: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar (M.c.) y urea (U.) con vitaminas (V\*\*) y minerales en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
M.c.40 g/l+U.1.2 g/l	4,9	5,1	3,7E+08	5,3E+08	1,43
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l+B.20 mg/l	4,9	5,0	3,7E+08	4,6E+08	1,24
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l+V.**	4,8	5,0	3,7E+08	7,0E+08	1,89
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l+Mn*Cu*	4,9	5,8	3,7E+08	4,9E+08	1,33
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l+B.20mg/l+Mn*Cu*	4,9	5,7	3,7E+08	4,2E+08	1,14
M.c.50 g/l+U.1,2 g/l (20 mM)	4,7	5,0	2,8E+08	4,0E+08	1,40
M.c.50 g/l+U.1,2 g/l+V.**	4,8	5,0	2,8E+08	4,1E+08	1,46
M.c.50 g/l+U.1,2 g/l+B.20 mg/l	4,9	5,1	2,8E+08	4,5E+08	1,58
M.c.50 g/l+U.1,2 g/l+ Mn*Cu*	4,8	5,0	2,8E+08	4,7E+08	1,65
M.c.50 g/l+U.1,2g/l+B.20mg/l+Mn*Cu*	4,9	5,3	2,8E+08	4,1E+08	1,45

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a): M.c.: melaza de caña de azúcar, U.: urea, V\*\*: vitaminas: Biotina 20 mg/l, Piridoxina 400 mg/l, B.: biotina.

\*  $MnSO_4 \cdot H_2O$  303 mg/l,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  40 mg/l.

Los resultados de las dos pruebas (Tabla 43) reflejan que el enriquecimiento del medio de melaza 40 g/l con los diferentes nutrientes no mejora el crecimiento, sino al contrario, lo disminuye ligeramente, con excepción del medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l y vitaminas (relación medio/NYDB = 1,89), que tiene mejor crecimiento que el medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l

(relación medio/NYDB = 1,43). Sin embargo, en el medio de melaza 50 g/l con urea 1,2 g/l al enriquecer el medio con los diferentes nutrientes antes mencionados se favorece el crecimiento.

El crecimiento en medios enriquecidos con biotina, con manganeso-cobre y con biotina-manganeso-cobre, es menor en el medio compuesto por biotina y ambas sales. Es decir, en este caso el exceso de biotina puede tener un efecto inhibitorio sobre el antagonista. Dicha inhibición se confirma nuevamente en los medios de melaza 40 g/l con urea y biotina, cuyos crecimientos son inferiores (relación medio/NYDB = 1,24) a los desarrollados en medios de melaza con urea, mientras que el crecimiento en medio de melaza 50 g/l con urea y biotina no se ve muy favorecido (relación medio/NYDB = 1,58).

La exposición anterior permite concluir que la melaza de caña de azúcar contiene en su composición la cantidad suficiente de biotina para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), ya que al enriquecerla con esta vitamina su concentración puede llegar a ser tan alta que inhiba el crecimiento del microorganismo antagonista (Stanbury *et al.*, 1995).

La variación del pH al final del crecimiento aumenta como en los medios de melaza de caña de azúcar enriquecidos con urea.

#### **3.1.4. Enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar con urea y fosfato hidrógeno de potasio.**

Dado que no se obtuvieron considerables mejoras en el crecimiento en medios de melaza de caña de azúcar enriquecidos con vitaminas, manganeso y cobre, se establece la alternativa de enriquecer el medio con fuentes de fósforo y potasio, que son elementos también deficientes en la melaza de caña de azúcar (Beudeker *et al.*, 1989). Así pues, se preparan medios de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l enriquecidos con fosfato hidrógeno de potasio (apartado 6.11 del capítulo de Material y Métodos).

Analizando la Tabla 44, se observa que la aportación de fosfato hidrógeno de potasio al medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l no favorece el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1): el medio simple de melaza de caña de azúcar tiene un mejor crecimiento (relación medio/NYDB = 1,43) que el medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l y fosfato hidrógeno de potasio 0,08 g/l (relación medio/NYDB = 1,02).

El pH al final del crecimiento aumenta, de igual modo que en el medio de melaza de caña de azúcar con urea.

Tabla 44: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de caña de azúcar (M.c.) con urea (U.) y fosfato hidrógeno de potasio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.NYDB	C.MEDIO	(1)
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l	4,8	5,4	3,7E+08	5,27E+08	1,43
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l+KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,04 g/l	5,4	5,7	3,7E+08	3,21E+08	0,87
M.c.40 g/l+U.1,2 g/l+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,08 g/l	5,4	6,4	3,7E+08	3,75E+08	1,02

C.NYDB: crecimiento del antagonista en medio NYDB, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(1): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio NYDB y en el medio que se está experimentando.

(a):M.c.: melaza de caña de azúcar, U.: urea.

En conclusión, tras las diversas pruebas de crecimiento realizadas en medios enriquecidos se comprueba lo establecido bibliográficamente: la melaza de caña de azúcar posee una rica composición en fuentes de carbono, compuestos de fósforo, potasio, magnesio, calcio, manganeso, cobre y vitaminas (especialmente biotina), componentes indispensables para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1); asimismo, necesita únicamente la suplementación de su deficiencia de nitrógeno, siendo la mejor fuente la urea.

La concentración ideal de ambos componentes es: melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l.

### 3.2. Incorporación de nutrientes en el medio de melaza de remolacha azucarera para determinar su influencia en el crecimiento del antagonista.

La melaza de remolacha azucarera es un medio rico en nutrientes (apartado 6.8 del capítulo de Material y Métodos). Contiene básicamente los mismos componentes que la melaza de caña de azúcar pero en diferentes proporciones (Imrie, 1969), así el nitrógeno se presenta en mayor porcentaje (1,0 - 2,5) que en la melaza de caña de azúcar (0,4 - 1,5) (Spencer y Spencer, 1997).

Para determinar la concentración más óptima de melaza de remolacha azucarera con urea para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se realizan tres experiencias con medios a distintas concentraciones de melaza de remolacha azucarera con urea (apartado 6.11 del capítulo de Material y Métodos).

En esta ocasión, la relación de crecimiento no se compara con el crecimiento en NYDB como hasta ahora se había realizado, sino con el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

Inicialmente se efectúa una prueba de crecimiento en medios de melaza de remolacha azucarera a

concentraciones de 30, 40 y 50 g/l cada uno con 0,6, 1,2 y 2,4 g/l de urea.

Tabla 45: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de remolacha azucarera (M.r.) con urea (U.) como fuente de nitrógeno en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.MELAZA	C.MEDIO	(2)
M.r. 30 g/l+U. 0,6 g/l	6,78	6,84	5,0E+08	1,8E+08	0,36
M.r. 40 g/l+U. 0,6 g/l	6,79	6,01	5,0E+08	3,7E+08	0,74
M.r. 50 g/l+U. 0,6 g/l	6,85	5,86	5,0E+08	4,0E+08	0,80
M.r. 30 g/l+U. 1,2 g/l	6,77	7,05	5,0E+08	1,8E+08	0,36
M.r. 40 g/l+U. 1,2 g/l	6,79	6,54	5,0E+08	2,6E+08	0,52
M.r. 50 g/l+U. 1,2 g/l	6,84	5,83	5,0E+08	2,5E+08	0,50
M.r. 30 g/l+U. 2,4 g/l	6,77	6,80	5,0E+08	8,5E+07	0,17
M.r. 40 g/l+U. 2,4 g/l	6,79	6,13	5,0E+08	1,9E+08	0,38
M.r. 50 g/l+U. 2,4 g/l	6,83	6,23	5,0E+08	2,4E+08	0,48

C.MELAZA: crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(2): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en el medio que se está experimentando.

(a): M.r.: melaza de remolacha azucarera, U.: urea.

Una vez elaborada la Tabla 45, se constata el mejor crecimiento en el medio de melaza de remolacha azucarera 50 g/l con urea 0,6 g/l, cuya relación medio/medio melaza de caña de azúcar es 0,80.

De acuerdo con este resultado se lleva a cabo una segunda prueba con melaza de remolacha azucarera a la concentración óptima de 50 g/l con concentraciones de urea cercanas a 0,6 g/l, es decir, 0,25, 0,5, 0,75 y 1,2 g/l. A continuación se experimenta con mayores concentraciones de melaza de remolacha azucarera, o sea, con 60, 70, 80, 90 y 110 g/l suplementada con las mismas concentraciones de urea antes mencionadas.

El análisis de los resultados (Tabla 46) confirma de nuevo el mejor crecimiento en el medio de melaza de remolacha azucarera 50 g/l al ser enriquecido con urea a razón de 0,6 g/l, puesto que en las otras concentraciones los valores alcanzados son más bajos.

El resto de resultados muestra un mejor crecimiento en el medio de melaza de remolacha azucarera 70 g/l con urea 1,2 g/l (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,99) respecto al medio de melaza de remolacha azucarera 50 g/l con urea 0,6 g/l (relación medio/medio melaza de caña de

azúcar = 0,80).

**Tabla 46: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de remolacha azucarera (M.r.) con urea (U.) como fuente de nitrógeno en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.MELAZA	C.MEDIO	(2)
M.r. 50 g/l+U. 0,25 g/l	6,9	6,0	6,8E+08	3,8E+08	0,56
M.r. 50 g/l+U. 0,50 g/l	6,9	5,8	6,8E+08	4,1E+08	0,60
M.r. 50 g/l+U. 0,75 g/l	6,9	5,8	6,8E+08	3,1E+08	0,46
M.r. 50 g/l+U. 1,20 g/l	6,9	6,1	6,8E+08	3,3E+08	0,49
M.r. 60 g/l+U. 0,25 g/l	6,9	5,9	6,8E+08	3,9E+08	0,57
M.r. 60 g/l+U. 0,50 g/l	6,9	5,8	6,8E+08	4,2E+08	0,62
M.r. 60 g/l+U. 0,75 g/l	6,9	5,8	6,8E+08	3,9E+08	0,57
M.r. 60 g/l+U. 1,20 g/l	6,9	5,7	6,8E+08	4,4E+08	0,65
M.r. 70 g/l+U. 0,25 g/l	7,0	5,8	6,8E+08	4,3E+08	0,64
M.r. 70 g/l+U. 0,50 g/l	6,9	5,8	6,8E+08	4,7E+08	0,69
M.r. 70 g/l+U. 0,75 g/l	6,9	5,7	6,8E+08	4,4E+08	0,65
M.r. 70 g/l+U. 1,20 g/l	6,9	5,8	6,8E+08	6,7E+08	0,99

C.MELAZA: crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en nfc/ml.

(2): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en el medio que se está experimentando.

(a): M.r.: melaza de remolacha azucarera, U.: urea.

Con el fin de determinar si la concentración de 70 g/l de melaza de remolacha azucarera con 1,2 g/l de urea es la mejor, se efectúa una tercera experiencia con concentraciones mayores de los dos componentes.

En base a la Tabla 47, el aumento de la concentración de urea en los medios a diferentes concentraciones de melaza disminuye el crecimiento, es decir, concentraciones mayores de 1,2 g/l de urea no son adecuadas para el buen crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Tabla 47: Influencia del enriquecimiento del medio de melaza de remolacha azucarera (M.r.) con urea (U.) como fuente de nitrógeno en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH INICIAL	pH FINAL	C.MELAZA	C.MEDIO	(2)
M.r. 70 g/l+U. 1,2 g/l	6,9	5,6	5,9E+08	5,5E+08	0,93
M.r. 70 g/l+U. 2,4 g/l	6,9	6,1	5,9E+08	1,7E+08	0,29
M.r. 70 g/l+U. 3,6 g/l	7,0	8,1	5,9E+08	9,2E+07	0,16
M.r. 90 g/l+U. 1,2 g/l	7,0	5,7	5,9E+08	5,3E+08	0,90
M.r. 90 g/l+U. 2,4 g/l	7,0	5,7	5,9E+08	1,3E+08	0,22
M.r. 90 g/l+U. 3,6 g/l	7,0	8,1	5,9E+08	3,2E+07	0,05
M.r. 110 g/l+U. 1,2 g/l	7,0	5,7	5,9E+08	2,2E+08	0,37
M.r. 110 g/l+U. 2,4 g/l	7,0	5,8	5,9E+08	1,3E+08	0,22
M.r. 110 g/l+U. 3,6 g/l	7,0	7,5	5,9E+08	1,1E+07	0,02

C.MELAZA: crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(2): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en el medio que se está experimentando.

(a): M.r.: melaza de remolacha azucarera, U.: urea.

A partir de una concentración de 70 g/l de melaza de remolacha azucarera con 3,6 g/l de urea disminuye el crecimiento (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,16). No obstante, en concentración de 90 g/l melaza con 1,2 g/l de urea aumenta de nuevo el crecimiento (relación medio/medio melaza de caña de azúcar 0,90), y el mismo medio con altas concentraciones de urea (3,6 g/l) disminuye aún más el crecimiento (relación medio/medio melaza de caña de azúcar 0,05). Por tanto, a altas concentraciones de melaza de remolacha azucarera y valores de urea superiores a 3,6 g/l se inhibe el crecimiento del microorganismo antagonista.

Por lo que se deduce que el mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se da en el medio de melaza de remolacha azucarera 70 g/l con urea 1,2 g/l, es decir, coincide con la concentración de urea usada en el medio de melaza de caña de azúcar (a 40 g/l con urea 1,2 g/l). Cabe señalar que según referencias bibliográficas la melaza de remolacha azucarera tiene mayor concentración de fuentes de nitrógeno que la melaza de caña de azúcar (Imrie, 1969; Reed y Nagodawithana 1991).



### 3.3. Crecimiento de la cepa *C. sake* (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.

Hasta aquí se ha determinado que el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l es el medio enriquecido donde se obtienen los mejores resultados de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), y que también se dan buenos crecimientos en el medio de melaza de remolacha azucarera 70 g/l con urea 1,2 g/l. A continuación, se estudia la posibilidad de mejorar la producción del antagonista mediante la combinación de estos dos medios, recomendado bibliográficamente (Imrie, 1969; Beudeker *et al.*, 1989; Reed y Nagodawithana, 1991).

Se realizan pruebas de crecimiento en medio combinado de melaza de caña de azúcar con melaza de remolacha azucarera en diferentes proporciones y urea (apartado 6.14 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 48: Influencia del enriquecimiento del medio combinado de melaza de caña de azúcar (M.c.) con melaza de remolacha azucarera (M.r.) a diferentes concentraciones, enriquecido con urea (U.) como fuente de nitrógeno en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN(a)	pH INICIAL	pH FINAL	C.MELAZA	C. MEDIO	(2)
M.r. 40 g/l+ U. 1,2 g/l.	7,1	7,4	7,4E+08	3,6E+08	0,49
M.c. 20g/l+ M.r. 20 g/l+U.1,2 g/l.	5,9	6,2	7,4E+08	7,5E+08	1,01
M.c. 10g/l+ M.r. 30 g/l+U.1,2 g/l.	6,2	6,1	7,4E+08	5,6E+08	0,76
M.c. 30 g/l+ M.r. 10 g/l+U.1,2 g/l.	5,6	5,6	7,4E+08	6,2E+08	0,84

C.MELAZA: crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(2): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en el medio que se está experimentando.

(a): M.c.: melaza de caña de azúcar, M.r.: melaza de remolacha azucarera, U.: urea.

El mejor resultado (Tabla 48) se produce en el medio de melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l y urea 1,2 g/l (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 1,01); de valor ligeramente superior al crecimiento en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y notoriamente mas alto que en el medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,49). Se concluye pues, que la mezcla de ambos medios en la misma proporción da un medio nutritivo con mejor crecimiento del antagonista e igual al obtenido en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, confirmándose las referencias bibliográficas antes citadas.

## 4. Determinación de las mejores condiciones de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

### 4.1. Determinación del mejor rango de pH.

El objetivo de esta parte experimental es determinar la influencia del pH en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en diferentes medios y analizar la influencia de la modificación del pH con ácidos/bases o disoluciones tamponantes en el crecimiento del antagonista.

Según referencias bibliográficas (Mossel e Ingram, 1955; Bridson y Brecker, 1987), las disoluciones tamponantes en el medio de crecimiento evitan los cambios bruscos de pH resultantes de la producción de metabolitos tóxicos por parte de los microorganismos durante su crecimiento, el cual se ve inhibido.

Se realizan pruebas en medios modificados con diferentes complejos tamponantes recomendados por Dawson *et al.*, (1989), Meynell y Meynell (1965) y Smelt *et al.* (1982).

#### 4.1.1. Modificación del pH en medio mínimo salino.

Como punto de partida se estudia la influencia del pH en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en un medio que contiene los componentes mínimos necesarios para su crecimiento y en el cual se ha modificado el pH original: con ácido clorhídrico y hidróxido de sodio en una primera parte; y con una disolución tampón de ácido cítrico 0,1 M/fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M en una segunda parte. A su vez se analiza si la disolución tampón disminuye o no la variación del pH al final del crecimiento. Para lo cual se prepara el medio mínimo salino utilizado por Usall (1995) y recomendado por Barnett *et al.* (1990) y Janisiewicz y Bors (1992) (apartado 7.2 del capítulo de Material y Métodos).

Los resultados detallados en la Tabla 49 ponen de relieve que existe una diferencia significativa en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) si los pH más adecuados se han modificado con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio o con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio, dándose el mejor crecimiento a pH 8 y a pH 4, respectivamente.

Cuando el medio mínimo tiene su pH modificado con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio el crecimiento es menor (pH 8 con mejor crecimiento igual a  $2,04 \cdot 10^8$  ufc/ml) que el medio modificado con disolución tampón (pH 4 con mejor crecimiento igual a  $4,28 \cdot 10^8$  ufc/ml). Se observa que a pH 4 el crecimiento es el doble que a pH 8.

Tabla 49: Influencia de la modificación del pH en medio mínimo salino con ácido clorhídrico, o hidróxido

de sodio y la disolución tampón ácido cítrico /fosfato hidrógeno de sodio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO
Medio mínimo HCl	3	3,1	2,7	5,90E+07
Medio mínimo HCl	4	4,0	3,4	5,25E+07
Medio mínimo HCl	5	5,1	4,0	5,60E+07
Medio mínimo NaOH	6	6,0	4,9	6,45E+07
Medio mínimo NaOH	7	7,0	5,8	1,54E+08
Medio mínimo NaOH	8	8,0	6,4	2,04E+08
Medio mínimo NaOH	9	9,1	8,7	3,20E+05
<i>Medio mínimo C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	3	3,1	2,9	1,11E+08
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	4	4,0	3,7	4,28E+08
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	5,1	4,6	3,69E+08
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6	6,0	5,5	3,34E+08
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7	7,0	6,6	2,78E+08
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8	7,8	7,6	2,40E+07
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9	8,9	8,7	1,09E+06

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>: ácido cítrico.

En el medio modificado con disolución tampón los mejores resultados se obtienen a pH ácido 4, mientras que en pH básico a partir de 8 disminuye el crecimiento ( $2,40 \cdot 10^7$  ufc/ml).

En el medio modificado con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio la tendencia es contraria, es decir que mejora a partir de pH 7 ( $1,54 \cdot 10^8$  ufc/ml) obteniéndose el mejor crecimiento a pH 8.

Además, se observa que a pH 3 en los medios modificados de cualquiera de las dos maneras el crecimiento es bajo, al igual que a pH 9 donde disminuye notoriamente.

En resumen, en el medio mínimo salino con pH modificado mediante una disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio, la cepa *C. sake* (CPA-1) tiene el mejor crecimiento en el rango de pH entre 4 y 7, siendo el óptimo el pH 4. La variación del pH al final del crecimiento es menor que en los medios modificados con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

#### 4.1.2. Modificación del pH en medio NYDB.

Para confirmar los resultados obtenidos en medio mínimo salino, en que su pH fue modificado con disoluciones tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio, se realizan pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio NYDB modificado a diferentes pH con la misma disolución tampón.

Se prepara el medio NYDB modificado a pH 3, 5, 7 y 8 con la disolución tampón ácido cítrico 0,1 M/fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M (apartado 7.3 del capítulo de Material y Métodos) y el antagonista se somete a crecimiento.

Según los resultados de la Tabla 50, el mejor crecimiento se presenta en el medio NYDB a pH 5 (con  $1,97 \cdot 10^8$  ufc/ml), comienza a disminuir a partir de pH 7 (con  $8,90 \cdot 10^7$  ufc/ml) y es bajo a pH 3 (con  $1,82 \cdot 10^7$  ufc/ml).

Tabla 50: Influencia de la modificación del pH del medio NYDB con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO (a)
3	3,2	2,9	1,82E+07
5	4,9	4,5	1,97E+08
7	7,1	6,8	8,90E+07
8	7,9	7,5	7,25E+07

(a): expresado en ufc/ml.

Por tanto, se ratifican los resultados obtenidos en medio mínimo salino pH 3 modificado con la misma disolución tampón, cuyo crecimiento era bajo ( $1,11 \cdot 10^8$  ufc/ml).

Con todo lo expuesto anteriormente, se confirma el estudio de Teixidó (1997) y Teixidó *et al.* (1998a): el mejor pH para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio NYDB modificado con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio es 5.

La variación del pH al final del crecimiento es menor que la que se da en el medio NYDB normal sin ninguna modificación de su pH, es decir, que la disolución ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio ejerce su acción tamponante.

#### 4.1.3. Modificación del pH en medio de melaza de caña de azúcar.

El objetivo de esta parte experimental es determinar el mejor pH óptimo de crecimiento de la cepa

*C. sake* (CPA-1) en el mejor medio de crecimiento: melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, modificando su pH con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio. En segundo lugar, se pretende determinar si la modificación del pH con esta disolución mejora el crecimiento del antagonista.

Se preparan medios de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l a diferentes pH desde 3 hasta 9 (apartado 7.4 del capítulo de Material y Métodos).

En la Tabla 51 se observa que existe un buen crecimiento en el rango de pH 4 (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,66) a pH 8 (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,75), siendo un poco bajo a pH 6 y disminuyendo el crecimiento a pH 9 (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,53). El mejor crecimiento se alcanza a pH 5 (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 1,08), que es ligeramente superior respecto al medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l sin modificación de su pH con disolución tampón.

Se puede concluir que el mejor rango de pH para el crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar con urea modificado con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio es de 4 a 8; similar al mejor rango de pH para el crecimiento en medio mínimo salino, que es de 4 a 7, modificado con la misma disolución tampón.

Tabla 51: Influencia de la modificación del pH del medio de melaza de caña de azúcar con urea, con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	C.MELAZA	C.MEDIO	(2)
3	3,1	3,4	3,6E+08	1,0E+08	0,28
4	4,0	4,5	3,6E+08	2,4E+08	0,66
5	5,0	5,5	3,6E+08	3,9E+08	1,08
6	5,9	6,3	3,6E+08	1,7E+08	0,47
7	6,9	7,3	3,6E+08	3,2E+08	0,89
8	8,0	8,3	3,6E+08	2,7E+08	0,75
9	9,1	9,4	3,6E+08	1,9E+08	0,53

C.MELAZA: crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, expresado en ufc/ml.

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml.

(2): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en el medio que se está experimentando.

La variación del pH al final del crecimiento no es muy amplia, cumpliéndose así el efecto tamponante de la disolución. Dicho efecto es menos visible en el pH cuyo crecimiento es mayor, y

puede deberse a la presencia de una mayor cantidad de metabolitos producto del crecimiento, los cuales modifican el pH de forma más acentuada.

#### 4.1.4. Modificación del pH en medio melaza de remolacha azucarera.

Partiendo de los resultados anteriores, se preparan medios de melaza de remolacha azucarera con pH a 4 y 5 modificado con ácido clorhídrico y con la disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio. Estos valores de pH son considerados los mejores para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

La preparación de los medios se realiza siguiendo la metodología del apartado 7.5 del capítulo de Material y Métodos.

De igual modo que en el medio de melaza de caña de azúcar, al examinar la Tabla 52 se observa un mejor crecimiento a pH 5 modificado con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,60), valor ligeramente superior al crecimiento obtenido en medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l sin modificación de su pH (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,46).

El crecimiento en medio a pH 5 modificado con ácido clorhídrico (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,53) es algo inferior al obtenido con disolución tampón, es decir, el ácido clorhídrico afecta ligeramente de forma negativa al crecimiento del antagonista.

Tabla 52: Influencia de la modificación del pH del medio de melaza de remolacha azucarera (M.r.) con urea (U.), con ácido clorhídrico y disolución tampón ácido cítrico /fosfato hidrógeno de sodio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	C.MELAZA	C.MEDIO	(2)
M.r.U.(Sin modific.pH)		7,0	6,7	7,0E+08	3,2E+08	0,46
M.r.U. C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	4,0	4,2	7,0E+08	2,9E+08	0,41
M.r.U. HCl	4	4,0	4,5	7,0E+08	2,3E+08	0,33
M.r.U. C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	5,0	5,6	7,0E+08	4,2E+08	0,60
M.r.U. HCl	5	4,9	6,2	7,0E+08	3,7E+08	0,53

C.MELAZA: crecimiento del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l

C.MEDIO: crecimiento del antagonista en el medio que se experimenta, expresado en ufc/ml

(2): relación entre el crecimiento del antagonista en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en el medio que se está experimentando.

(a): M.r.U.: medio melaza remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>: ácido cítrico.

Al comparar con los resultados de la anterior experiencia, se constata un mejor crecimiento en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y pH modificado a 5 con disolución tampón (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 1,08). El umbral alcanzado es ligeramente superior que en medio de melaza de caña de azúcar con urea a iguales concentraciones sin modificación de su pH, y que en medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l y pH modificado a 5 con disolución tampón (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,60).

Considerando las discusiones anteriores, se puede afirmar que el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es mejor a pH 5 en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l modificado con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio; mientras que también hay un buen crecimiento en medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l a pH 5 modificado con la misma disolución tampón.

Como resumen de todas las experiencias de crecimiento en disoluciones a diferentes pH, se confirma que el mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) tiene lugar a un pH entre 4 y 5 en los medios: melaza de caña de azúcar, melaza de remolacha azucarera, NYDB y medio mínimo salino, cuyos pH se han modificado con la misma disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio. Además, se confirma la referencia bibliográfica en que la disolución tampón, según el medio y el crecimiento, reduce con mayor o menor intensidad la variación del pH, favoreciendo de esta manera un poco el crecimiento del antagonista *C. sake* (CPA-1).

La afirmación precedente se pone de manifiesto con el crecimiento ligeramente superior en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l a pH 5 modificado con tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio (relación medio/ medio melaza de caña de azúcar = 1,08) frente al del medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l sin modificación del pH.

#### **4.1.5. Modificación del pH del medio mínimo salino con diferentes disoluciones tampones a diferentes pH.**

A partir del estudio anterior en medio mínimo salino modificado con disolución tampón ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio, se pretende determinar la existencia de otra disolución tamponante que actúe regulando el pH y favoreciendo el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). Con dicho fin, se preparan medios mínimos con disoluciones tampón: ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio (Clark y Lubs, 1916), tartrato hidrógeno de potasio (Hitchcock y Taylor, 1939; Lingane, 1947), fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio (Sörensen, 1912), fosfato hidrógeno de sodio con acetato de sodio/hidróxido de sodio (Walpole, 1914), ácido bórico/cloruro de potasio/hidróxido de sodio (Clark y Lubs, 1916), acetato de sodio/ácido acético (Walpole, 1914) (apartado 7.6 del capítulo de Material y Métodos).

Después de someter a crecimiento el antagonista se analizan los resultados (Tabla 53). El mejor crecimiento se da en el medio mínimo salino modificado con el tampón ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio ( $1,25 \cdot 10^8$  ufc/ml) y en segundo lugar en medio mínimo modificado con tartrato hidrógeno de potasio ( $1,13 \cdot 10^8$  ufc/ml).

Entre los medios modificados a pH 8 con disoluciones tamponantes, el medio tamponado con acetato de sodio/hidróxido de sodio presenta un bajo crecimiento ( $2,41 \cdot 10^6$  ufc/ml), mientras que en el medio modificado con el complejo tamponante acetato de sodio/ácido acético no existe casi crecimiento ( $8,9 \cdot 10^4$  ufc/ml).

Por consiguiente, en un medio mínimo salino modificado a pH 8 con una disolución tamponante que contenga como base el hidróxido de sodio no se obtiene un buen crecimiento del antagonista. Resultado que corrobora la experiencia precedente llevada a cabo en medio mínimo salino modificado a pH 8 con hidróxido de sodio (apartado 4.1.1 del capítulo de Resultados).

Tabla 53: Influencia de la modificación del pH del medio mínimo salino con diferentes disoluciones tamponantes en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO (a)
Medio mínimo. $C_8H_5O_4K/NaOH$	4	4,1	4,1	$1,25E+08$
Medio mínimo $C_4H_5O_6K$	4	4,0	2,5	$1,13E+08$
Medio mínimo $CH_3COONa/CH_3COOH$	4	3,9	3,9	$8,90E+04$
Medio mínimo $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$	7	6,7	3,0	$1,08E+08$
Medio mínimo $Na_2HPO_4$	7	6,8	3,0	$9,85E+07$
Medio mínimo $CH_3COONa/NaOH$	8	8,0	7,0	$2,41E+06$

(a): expresado en ufc/ml.

(b):  $C_8H_5O_4K$ : ftalato hidrógeno de potasio,  $C_4H_5O_6K$ : tartrato hidrógeno de potasio,  $H_3BO_3$ : ácido bórico.

En definitiva, se puede establecer que entre las disoluciones tamponantes que favorecen ligeramente el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) están los complejos: ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio, cuya variación del pH al final del crecimiento apenas existe; tartrato hidrógeno de potasio, que conlleva un cambio del pH; y fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio, cuya variación del pH es mayor.



#### 4.1.6. Crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio mínimo salino con diferentes fuentes de carbono que reemplazan a la glucosa y actúan como reguladores del pH.

Tras la realización de pruebas de crecimiento en medios mínimos salinos con disoluciones tamponantes se ha determinado que hay mejores crecimientos de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el complejo tamponante ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio. Seguidamente, se estudia como influyen los componentes de las disoluciones tamponantes en el crecimiento del antagonista, al actuar como fuente de carbono y reguladores del pH. Para ello se preparan medios mínimos salinos: el primero, con glucosa a concentración 0,06 M; el segundo, sin glucosa; en el resto la glucosa (fuente de carbono) es reemplazada con ácido cítrico 0,02 M, tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M y ftalato hidrógeno de potasio 0,1 M, hasta llegar a un pH no inferior a 4 (apartado 7.7 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 54: Influencia de la modificación del pH del medio mínimo salino con diferentes disoluciones tamponantes como fuentes de carbono en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN (b)	pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO (a)
Medio mínimo sin glucosa		5,89	5,93	5,25E+04
Medio mínimo con glucosa (0,06 M)		4,79	2,48	8,60E+07
Medio mínimo C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (0,00 2M)	4	4,02	4,06	4,10E+07
Medio mínimo C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> K (0,3 M)	4	4,01	2,47	1,13E+08
Medio mínimo C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> K (0,1 M)	4	4,05	3,57	1,45E+08

(a): expresado en ufc/ml.

(b): C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>K: ftalato hidrógeno de potasio, C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub>K: tartrato hidrógeno de potasio, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>: ácido cítrico.

Una vez examinada la Tabla 54 se comprueba que el ftalato hidrógeno de potasio es una buena fuente de carbono con un crecimiento de  $1,45 \cdot 10^8$  ufc/ml; la variación del pH es pequeña, es decir, ejerce un buen efecto tamponante. El tartrato hidrógeno de potasio también da un buen crecimiento ( $1,13 \cdot 10^8$  ufc/ml), pero la variación del pH es amplia. Estos dos crecimientos son superiores a los obtenidos en el medio mínimo salino con glucosa como fuente de carbono ( $8,6 \cdot 10^7$  ufc/ml).

#### 4.1.7. Influencia de disoluciones tamponantes en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio de melazas a diferentes pH.

Las pruebas de crecimiento del antagonista en medio mínimo salino con disoluciones tamponantes,

estudiadas en el apartado 4.1.5 del presente capítulo de Resultados, permiten seleccionar los mejores complejos: ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio, ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio, fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio y tartrato hidrógeno de potasio. Así pues, se preparan medios de crecimiento con melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l (apartado 7.4 y 7.5 del capítulo de Material y Métodos).

El medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l con la disolución tamponante ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio da el mejor crecimiento ( $2,99 \cdot 10^8$  ufc/ml) (Tabla 55). Además, posee una pequeña acción tamponante sobre el medio de crecimiento, cuyo pH varía de 7 a 6,4 tras el crecimiento, en tanto que en el medio mínimo salino anteriormente experimentado ejercía una mayor acción tamponante.

Tabla 55: Influencia de la modificación del pH del medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l (M.c.U.) y melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l (M.r.U.), con disoluciones tamponantes en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO (a)
M.c.U. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	7	6,9	6,6	2,54E+08
M.c.U. C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> K/NaOH	7	7,0	6,4	2,99E+08
M.c.U. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	6,9	7,0	4,84E+06
M.c.U. C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub> K	7	6,9	4,0	1,02E+08
M.r.U. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	7	7,0	7,1	5,43E+07
M.r.U. C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> K/NaOH	7	6,9	6,5	2,35E+08
M.r.U. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	7,0	7,1	2,25E+04
M.r.U. C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub> K	7	6,9	4,3	9,36E+07

(a): expresado en ufc/ml.

(b): M.c.U.: medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, M.r.U.: medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>K: ftalato hidrógeno de potasio, C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>O<sub>6</sub>K: tartrato hidrógeno de potasio, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>: ácido cítrico.

El crecimiento manifestado en este medio es superior al de la melaza de remolacha azucarera con urea a iguales concentraciones y con la misma disolución tamponante ( $2,35 \cdot 10^8$  ufc/ml), y cuyo pH tiene una variación igual a la anterior (va de 6,9 a 6,5).

Asimismo, existe un buen crecimiento en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l en tampón fosfato hidrógeno de sodio/ácido cítrico ( $2,54 \cdot 10^8$  ufc/ml), y con una mínima

variación del pH del medio tras el crecimiento del antagonista (de 6,9 a 6,6), dándose también el efecto tamponante de la disolución.

Teniendo en cuenta estos resultados y comparándolos con experiencias anteriores, se concluye que en los mejores medios: melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera con urea y con disoluciones tamponantes ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio y fosfato hidrógeno de sodio/ácido cítrico, existe un ligero efecto tamponante durante el crecimiento del antagonista, sin que mejore notoriamente.

#### 4.2. Determinación de la influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar con urea.

Las levaduras tienen capacidad de crecer a reducidas actividades de agua (Hocking, 1986). El objetivo del siguiente apartado experimental es determinar la actividad de agua ( $a_w$ ) más baja que permite el crecimiento del antagonista *C. sake* (CPA-1) en medio de melaza de caña de azúcar a diferentes concentraciones, y por tanto, a diferentes  $a_w$  y con urea a concentración fija (1,2 g/l).

Con este fin, se preparan los medios de crecimiento con urea 1,2 g/l y melazas en concentración de: 40 g/l con una  $a_w$  de 0,999; 250 g/l con una  $a_w$  0,972; 350 g/l con una  $a_w$  0,968 y 500 g/l con una  $a_w$  de 0,966 (apartado 8 del capítulo de Material y Métodos).

Se somete a crecimiento el microorganismo en matraces Erlenmeyer, con un medio exterior que se encuentra a la misma  $a_w$  que el medio de crecimiento.

Tabla 56: Influencia de la modificación de la actividad de agua en medio de melaza de caña de azúcar (M.c.) con urea (U.) en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

COMPOSICIÓN	pH INICIAL	pH FINAL	$a_w$	CRECIMIENTO(a)
M.c. 40 g/l + U. 1,2 g/l	4,8	6,6	0,999	4,38E+08
M.c. 250 g/l + U. 1,2 g/l	4,7	6,0	0,972	3,32E+08
M.c. 350 g/l + U. 1,2 g/l	4,7	6,2	0,968	1,37E+08
M.c. 500 g/l + U. 1,2 g/l	4,9	5,9	0,966	2,03E+07

(a): expresada como ufc/mL

$a_w$ : actividad de agua del medio de crecimiento.

El crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) a  $a_w$  0,998, correspondiente al medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l, presenta el crecimiento más alto ( $4,38 \cdot 10^8$  ufc/ml). Al compararlo con medios a

$a_w$  de 0,972 y 0,968, cuyos crecimientos respectivos son de  $3,32 \cdot 10^8$  ufc/ml y  $1,37 \cdot 10^8$  ufc/ml, se constata que no hay una gran diferencia (Tabla 56). Pero a partir de un medio con una  $a_w$  0,966 comienza a decrecer notoriamente ( $2,03 \cdot 10^7$  ufc/ml).

Se confirma así que la cepa *C. sake* (CPA-1) presenta una amplia tolerancia y un buen crecimiento a bajas  $a_w$ , estudiado por Teixidó (1997; 1998b), Teixidó *et al.* (1998a), pero a muy bajas  $a_w$  es menos tolerante que otras *Candida* spp.: *C. cacaoi* (rango de  $a_w$  de 0,83-0,84), *C. magnoliae* (rango de  $a_w$  de 0,82-0,88) (Van Eck *et al.*, 1993).

## 5. Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1).

### 5.1. En medio de melaza de caña de azúcar con urea a 20 °C, 25 °C y 30 °C.

El objetivo del presente ensayo es determinar la evolución de la población de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l a diferentes temperaturas, con el fin de establecer el intervalo de temperatura ideal para el crecimiento del antagonista. Así como el intervalo de tiempo en el cual el microorganismo presenta el mayor crecimiento, siendo de gran importancia a nivel industrial.

Usall (1995) en sus investigaciones indica que la cepa *C. sake* (CPA-1) no crece a 37 °C, temperatura del cuerpo humano, hecho también expuesto por Hurley *et al.* (1987), quien dice que este microorganismo no se ha encontrado asociado con animales de sangre caliente.

La dinámica poblacional de la cepa antagonista (CPA-1) de *C. sake* en medio NYDB ya ha sido determinada en trabajos anteriores realizados en el “Laboratori de Patologia de l’Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA” de Lleida (Usall, 1995). Gracias a ellos se acotó el rango óptimo de crecimiento en medio NYDB, el cual se encuentra entre 25 y 30 °C, mientras que a partir de 34 °C disminuye.

Se prepara medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2 del capítulo de Material y Métodos. Se inocula el antagonista y se somete a crecimiento, tomándose diferentes muestras a intervalos periódicos de tiempo para hacer la curva de crecimiento (apartado 21.2 del capítulo de Material y Métodos).

La primera prueba de crecimiento y análisis comparativo entre la dinámica poblacional del antagonista se efectúa a las temperaturas de 20 °C, 25 °C y 30 °C.

A las 24 horas de crecimiento (Figura 1), se puede observar que la cepa *C. sake* (CPA-1) se encuentra en fase de multiplicación celular, entrando en un crecimiento exponencial, con una

velocidad máxima de crecimiento de 3 a 4 exponentes, que está influenciado por la temperatura.

Comparando entre poblaciones microbianas a este tiempo y a distintas temperaturas, se tiene que el crecimiento a 20 °C es menor ( $7,63 \cdot 10^6$  ufc/ml), con una marcada diferencia de más de la mitad respecto a 25 y 30 °C, que presentan los mejores y similares crecimientos ( $1,21 \cdot 10^7$  ufc/ml).

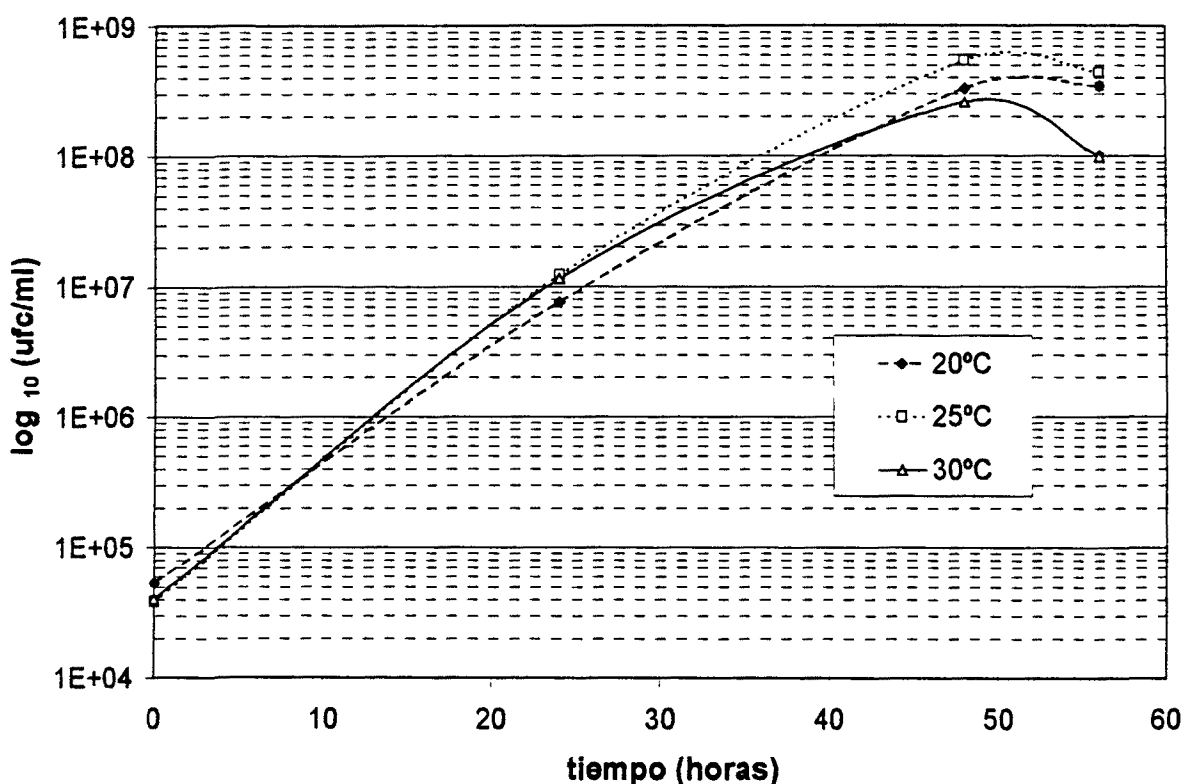


Figura 1: Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) (ufc/ml) en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l a pH 7 incubada a 20 °C, 25 °C y 30 °C.

El microorganismo continúa multiplicándose, pero con menos intensidad como bien muestra la disminución de la pendiente de la curva, y como bien se observa a las 48 horas en que se acentúa la diferencia de crecimiento: a 25 °C es casi el doble ( $5,38 \cdot 10^8$  ufc/ml) que a 30 °C ( $2,58 \cdot 10^8$  ufc/ml) y mayor que a 20 °C.

A las 56 horas se halla en la fase estacionaria, tanto a 20 °C como a 25 °C, aunque se empieza a notar un ligero descenso de la población microbiana, un poco más acentuado a 30 °C. Se pone en evidencia pues, la sensibilidad de la cepa *C. sake* (CPA-1) a temperaturas superiores a 30 °C.

## 5.2. En medio de melaza de caña de azúcar con urea a 22 °C, 24 °C y 26 °C.

Con la segunda prueba de crecimiento que se realiza a 22 °C, 24 °C y 26 °C se pretende acotar el rango de temperatura más óptimo para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar con urea.

Se prepara medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l (medio ENR 22 del apartado 6.5.2 del capítulo de Material y Métodos), se inocula el antagonista y se somete a crecimiento tomando distintas muestras a intervalos periódicos de tiempo para diseñar la curva de crecimiento (apartado 21.2 del capítulo de Material y Métodos).

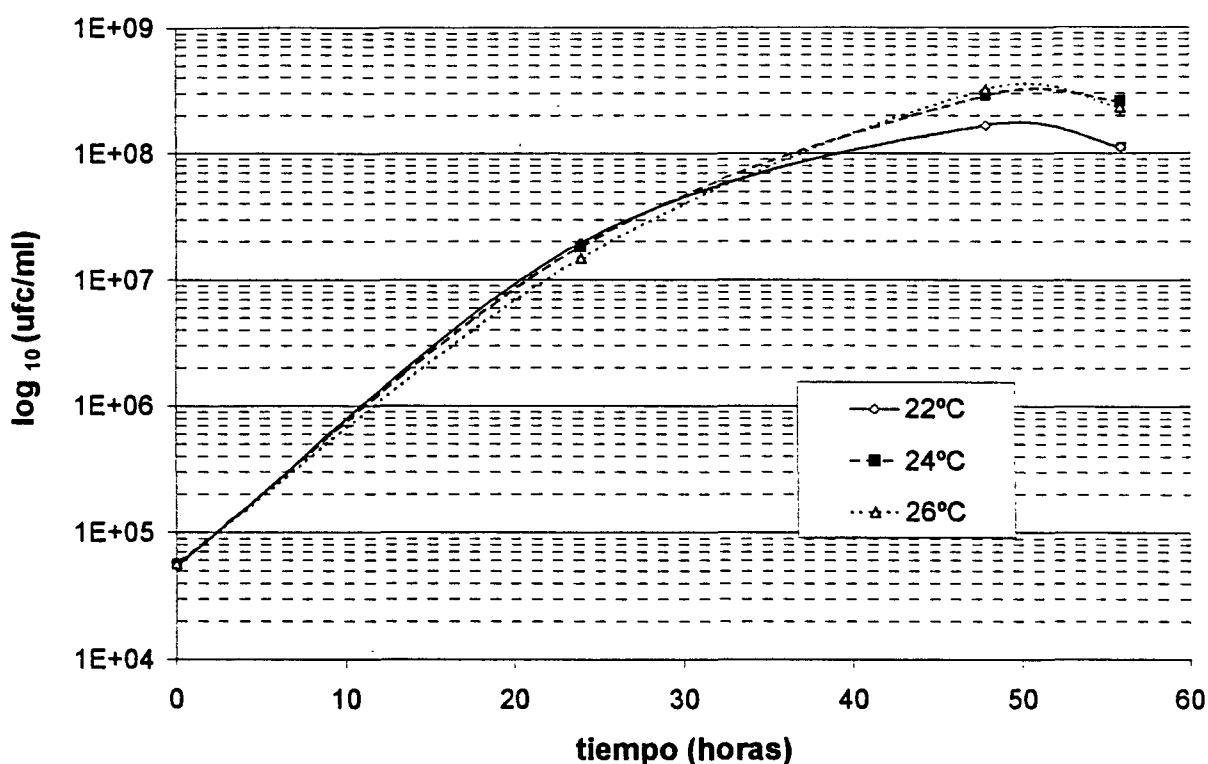


Figura 2: Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) (ufc/ml) en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l a pH 7 incubada a 22 °C, 24 °C y 26 °C.

Al cabo de 24 horas (Figura 2) el antagonista presenta su mayor velocidad de crecimiento, dada la mayor pendiente de la curva, y su crecimiento a las diferentes temperaturas ensayadas es parecido en todas ellas.

Más adelante, el microorganismo continúa multiplicándose pero con menos intensidad, como se denota a las 48 horas, a la vez que se acentúa la diferencia de crecimientos: a 22 °C es casi la mitad ( $1,67 \cdot 10^8$  ufc/ml) que a 24 °C ( $2,87 \cdot 10^8$  ufc/ml) y a 26 °C se obtiene la mayor masa poblacional ( $3,22 \cdot 10^8$  ufc/ml).

A las 56 horas en todos los casos el crecimiento se detiene, es decir, la población microbiana permanece constante con una ligera disminución pero sin apreciables diferencias entre temperaturas.

Durante las primeras 24 horas de crecimiento, a temperaturas inferiores de 20 °C y 22 °C, los crecimientos son casi la mitad que en el resto de temperaturas (24, 25, 26 y 30 °C), para después igualarse a las 48 horas.

Tras un examen global, se determina que en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l el intervalo de temperatura en que el antagonista tiene un mejor crecimiento es de 24 °C a 26 °C, resultados acordes con los obtenidos en estudios precedentes desarrollados en medio NYDB por Usall (1995). Para todas las temperaturas ensayadas el mayor crecimiento tiene lugar a las 48 horas de iniciar el estudio.

### **5.3. En medio de melaza de caña de azúcar con urea a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ).**

Con referencia a los anteriores resultados de crecimiento del antagonista a diferentes  $a_w$  (apartado 4.2 del capítulo de Resultados), con este nuevo ensayo se pretende determinar la influencia de la  $a_w$  en la dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio de melaza de caña de azúcar con urea 1,2 g/l, variando la concentración de la melaza para obtener las diferentes  $a_w$ , y conocer el efecto de la reducción de la  $a_w$  en la velocidad de crecimiento a diferentes tiempos.

De igual modo que la experiencia precedente, se utilizan los mismos medios de crecimiento, con urea 1,2 g/l y: melaza en concentraciones de: 40 g/l con una  $a_w$  0,999; 250 g/l con una  $a_w$  0,972; 350 g/l con una  $a_w$  0,968 y 500 g/l con una  $a_w$  0,966 (apartado 21.3 del capítulo de Material y Métodos).

El microorganismo se somete a crecimiento en matraces Erlenmeyer, con un medio exterior que se encuentra a la misma  $a_w$  que el medio de crecimiento.

Se observa que las primeras 14 horas la cepa *C. sake* (CPA-1) se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento (Figura 3). A las  $a_w$  0,999 y 0,972 el crecimiento es parecido y del orden del exponente 7; a  $a_w$  0,968 es menor con  $2,65 \cdot 10^5$  ufc/ml, y mucho más bajo a  $a_w$  0,966 con un crecimiento de  $4,5 \cdot 10^4$  ufc/ml.

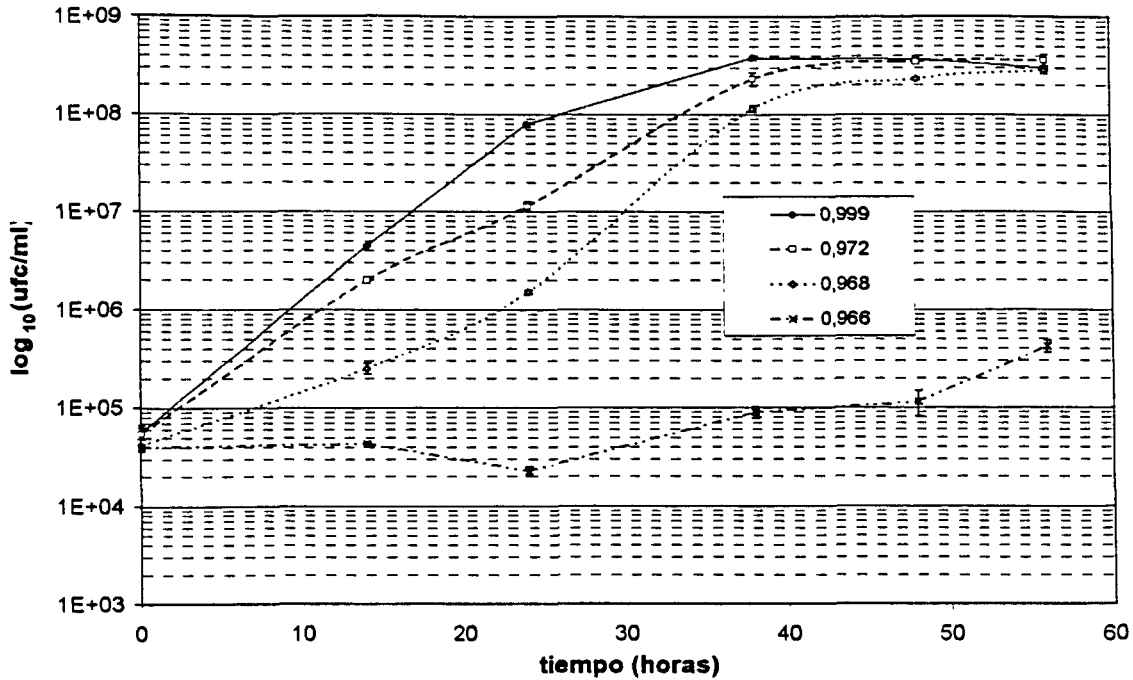


Figura 3: Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) (ufc/ml) en medio de melaza de caña de azúcar a diferentes concentraciones con urea 1,2 g/l a diferentes actividades de agua.

Tras 24 horas continúa en la fase logarítmica, pero el crecimiento varía en función de la  $a_w$ : a  $a_w$  0,999 ( $7,85 \cdot 10^7$  ufc/ml) es mayor que a  $a_w$  0,972 ( $1,01 \cdot 10^7$  ufc/ml), disminuye más a  $a_w$  0,968 ( $1,58 \cdot 10^6$  ufc/ml), hasta alcanzar el valor más bajo a  $a_w$  0,966 ( $2,25 \cdot 10^4$  ufc/ml). A esta  $a_w$  el microorganismo experimenta un descenso de su población que a las 14 horas era de  $4,5 \cdot 10^4$  ufc/ml.

En el intervalo de 30 a 40 horas sigue su crecimiento, mostrándose diferencias en función de las actividades de agua. A las 38 horas a  $a_w$  0,999 presenta la mayor población microbiana, en tanto que a las  $a_w$ , 0,972 y 0,968 la mayor población microbiana se da a las 48 horas, siendo mayor la proporción de aumento a  $a_w$  0,968.

En cambio, a las 48 horas se observa una ligera disminución del crecimiento a  $a_w$  0,999, en oposición a la mejora que experimenta a  $a_w$  0,966 ( $9,5 \cdot 10^4$  ufc/ml), cuyo crecimiento es bajo en relación a los obtenidos a las otras  $a_w$ .

A las 56 horas se mantiene la misma tendencia, no hay un aumento en el crecimiento y es parecido a las  $a_w$ , 0,999, 0,972 y 0,968 y más bajo a  $a_w$  0,966.

En conclusión, la cepa *C. sake* (CPA-1) manifiesta un buen crecimiento en medio de melaza de caña de azúcar con urea hasta una  $a_w$  de 0,968: en el transcurso de las primeras 24 horas presenta crecimientos inferiores a las otras  $a_w$ , pero a partir de las 38 horas llega a iguales crecimientos que  $a_w$  0,972 y 0,999. El medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l tiene  $a_w$  0,999 y es donde se obtiene el mejor crecimiento del antagonista.



#### **5.4. En el medio de melaza de caña de azúcar con urea en fermentador.**

Una de las partes más importantes del presente trabajo consiste en encontrar las condiciones más adecuadas para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, como paso previo para poder producir el microorganismo antagonista en grandes cantidades a escala industrial y en un corto período de tiempo. Por consiguiente, se realizan ensayos a pequeña escala en fermentador en las mejores condiciones de temperatura y pH encontradas en experiencias anteriores, y determinar así la evolución en el tiempo de la población microbiana del antagonista.

Se trabaja a 25 °C de temperatura, al encontrarse dentro del rango óptimo de crecimiento, con el fin de obtener el máximo poblacional en un corto período de tiempo.

Se prepara el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l (medio ENR 22 del apartado 6.5.2 del capítulo de Material y Métodos). Se inocula el microorganismo antagonista en un fermentador de 5 l de capacidad que contiene 3 l de medio de cultivo, con una aireación de 300 ml/min con velocidad de agitación de 200 rpm y se somete a crecimiento (apartado 21.4 del capítulo de Material y Métodos).

El inóculo iniciador creció previamente en el mismo medio de melaza de caña de azúcar con urea y se adiciona al fermentador en la fase logarítmica de crecimiento, a fin de minimizar el tiempo de adaptación del microorganismo al nuevo medio.

Durante las primeras 13 horas de incubación en fermentador, la cepa microbiana aumenta su población en tres exponentes, de  $1,77 \cdot 10^3$  ufc/ml a  $4,79 \cdot 10^6$  ufc/ml. En las 5 horas sucesivas el aumento de población es el máximo, dada la pendiente de la curva, encontrándose en la mayor velocidad de crecimiento (Figura 4) y multiplicándose por 11 veces su población. Este incremento continúa en la fase logarítmica de crecimiento exponencial hasta las 24 horas de incubación ( $1,54 \cdot 10^8$  ufc/ml).

En el intervalo de tiempo de 24 a 42 horas continúa aumentando la población microbiana pero con menor velocidad, deduciendo que el microorganismo se encuentra en período de transición de la fase logarítmica a la estacionaria.

A partir de las 42 horas entra en la fase estacionaria, período de tiempo donde se obtiene una mayor población microbiana, con una concentración aproximada de  $3,57 \cdot 10^8$  ufc/ml.

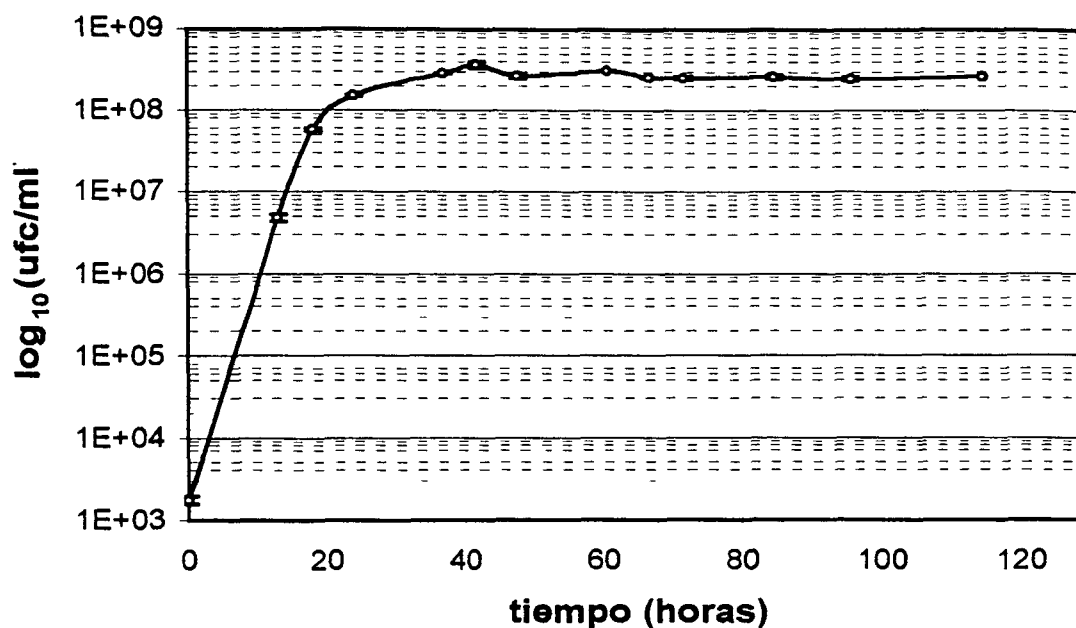


Figura 4: Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) (ufc/ml) en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l en fermentador.

Pasadas 48 horas sigue en la fase estacionaria ( $2,63 \cdot 10^8$  ufc/ml) hasta las 115 horas, en que el crecimiento permanece constante ( $2,60 \cdot 10^8$  ufc/ml).

### 5.5. En medio de melaza de remolacha azucarera con urea en fermentador.

Al igual que en el medio de melaza de caña de azúcar con urea, se realizan ensayos de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) a pequeña escala en fermentador en medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l. Se trabaja en las mejores condiciones de temperatura y pH, halladas en experiencias anteriores, para determinar la evolución de la población microbiana y se selecciona 25 °C como la temperatura más adecuada para su crecimiento.

Se preparan tres litros de medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l (medio ENR 51 del apartado 6.12.2 del capítulo de Material y Métodos). Se inocula el microorganismo antagonista partiendo de un inóculo iniciador, en un fermentador de 5 l de capacidad con una aireación de 300 ml/min con velocidad de agitación de 200 rpm, y se somete a crecimiento (apartado 21.5 del capítulo de Material y Métodos).



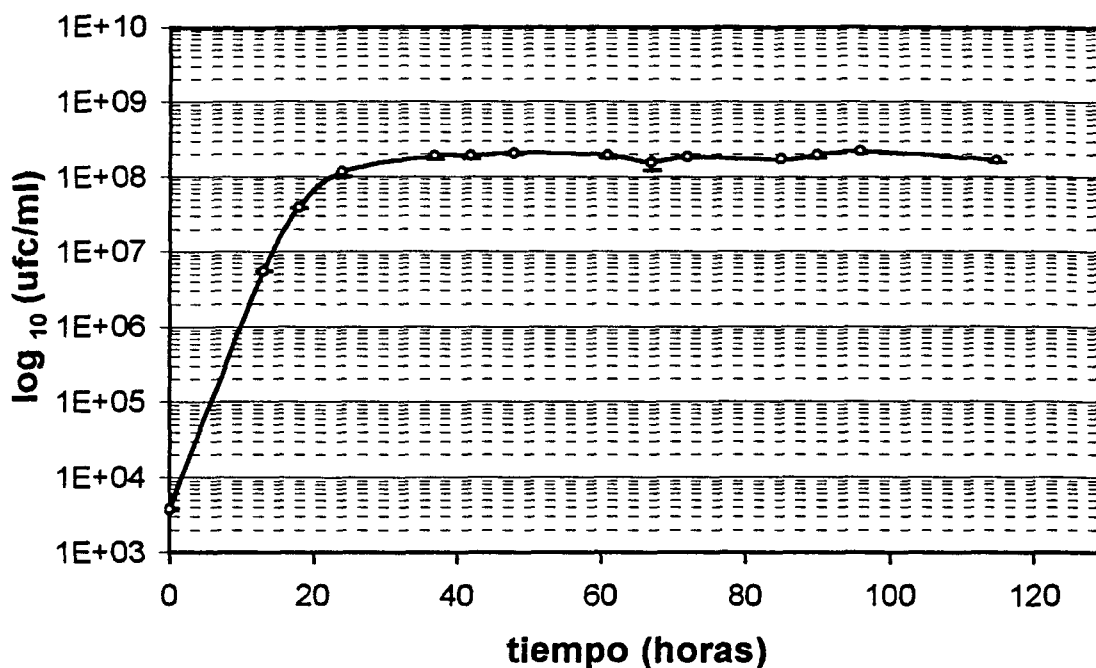


Figura 5: Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) (ufc/ml) en medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l+urea 1,2 g/l en fermentador

Durante las primeras 13 h de incubación en fermentador, al igual que en el medio de melaza de caña de azúcar, la cepa *C. sake* (CPA-1) incrementa su población en tres exponentes, de  $3,82 \cdot 10^3$  ufc/ml a  $5,58 \cdot 10^6$  ufc/ml, y se encuentra en la fase logarítmica y de mayor velocidad de multiplicación celular (Figura 5). En las siguientes 6 horas multiplica su población por 7 veces y se mantiene en fase logarítmica hasta las 24 horas de incubación ( $1,16 \cdot 10^8$  ufc/ml).

En el intervalo de 24 a 37 horas, se halla en la transición de fase logarítmica a estacionaria, hecho evidente por la disminución de la pendiente de la curva de crecimiento. A partir de las 37 horas entra en la fase estacionaria con un crecimiento de  $1,91 \cdot 10^8$  ufc/ml; la población se mantiene constante hasta llegar a su máximo de población microbiana a las 48 horas con una concentración aproximada de  $2,05 \cdot 10^8$  ufc/ml.

A las 61 horas sigue en la fase estacionaria ( $1,94 \cdot 10^8$  ufc/ml) y el crecimiento se mantiene estable hasta las 115 horas de nuestro estudio en donde la población es de  $1,84 \cdot 10^8$  ufc/ml.

Si se comparan los crecimientos del antagonista en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, se observa que el máximo de crecimiento se alcanza antes en el medio de melaza de caña de azúcar (alrededor de las 42 horas) que en medio de melaza de remolacha azucarera (alrededor de las 48 horas). Asimismo, el mayor crecimiento en medio de melaza de caña de azúcar, pero en matraces Erlenmeyer sometidos a una agitación a 150 rpm, se obtiene a las 39 horas.

Existe un mayor crecimiento cuando el microorganismo es incubado en fermentador con medio de melaza de caña de azúcar con urea ( $3,57 \cdot 10^8$  ufc/ml) que en fermentador en medio de melaza de remolacha azucarera con urea ( $2,05 \cdot 10^8$  ufc/ml), partiendo de una misma concentración de inóculo.

## **5.6. En la superficie de la fruta bajo diferentes condiciones de frigoconservación.**

La siguiente experiencia tiene por objetivo establecer el efecto de diferentes relaciones de oxígeno/dióxido de carbono (atmósfera controlada) sobre la población de la cepa *C. sake* (CPA-1) desarrollada sobre la superficie de manzana "Golden Delicious" conservada a 1 °C, para lo cual se trabaja con fruta fresca correspondiente a la campaña 1996/97.

Los frutos, tras recibir pequeñas heridas, se someten a un baño con una concentración de antagonista de  $2 \cdot 10^6$  ufc/ml, que corresponde a un 49,4 % de transmitancia, y se conservan a las distintas concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono (apartado 21.6 del capítulo de Material y Métodos).

Se toman muestras a intervalos amplios de tiempo debido a la apertura restringida que tienen este tipo de cámaras frigoríficas (0, 15, 31, 60 y 95 días).

La evolución de la población de *C. sake* (CPA-1) sobre la superficie de la manzana conservada a diferentes atmósferas de frigoconservación queda reflejada en la Figura 6. Se parte de una población de aproximadamente  $1,33 \cdot 10^3$  ufc/g; se observa en todas las condiciones estudiadas que durante los primeros 15 días de frigoconservación la población sufre un descenso causado por el cambio brusco de temperatura y del contenido de gases. Se llega a niveles relativamente bajos que varían según las condiciones de frigoconservación, así en la atmósfera 2 % O<sub>2</sub> - 4 % CO<sub>2</sub> se tiene la población más baja de las diferentes atmósferas ( $1,7 \cdot 10^2$  ufc/g).

Entre los 15 y 30 días, el microorganismo se adapta a las diferentes condiciones y comienza a crecer, con excepción de 3 % O<sub>2</sub> - 3 % CO<sub>2</sub> y 2 % O<sub>2</sub> - 6 % CO<sub>2</sub> en que disminuye ligeramente.

Entre los 30 y 60 días el microorganismo crece en todas las condiciones estudiadas, siendo mayor en la atmósfera 1 % O<sub>2</sub> - 1 % CO<sub>2</sub>.

Entre los 60 y los 95 días sigue aumentando la población del microorganismo en casi todas las atmósferas, con excepción de 2 % O<sub>2</sub> - 2 % CO<sub>2</sub>, donde comienza a disminuir ligeramente, y a 1 % O<sub>2</sub> - 1 % CO<sub>2</sub>, donde la disminución es más acentuada, mientras que en el resto de atmósferas aumenta la población.

Por lo antes expuesto, observamos que en la mayoría de las diferentes condiciones de atmósferas de frigoconservación se consigue la máxima población microbiana alrededor de los 95 días, con

excepción de las atmósferas 2 % O<sub>2</sub> - 2 % CO<sub>2</sub> y 1 % O<sub>2</sub> - 1 % CO<sub>2</sub>

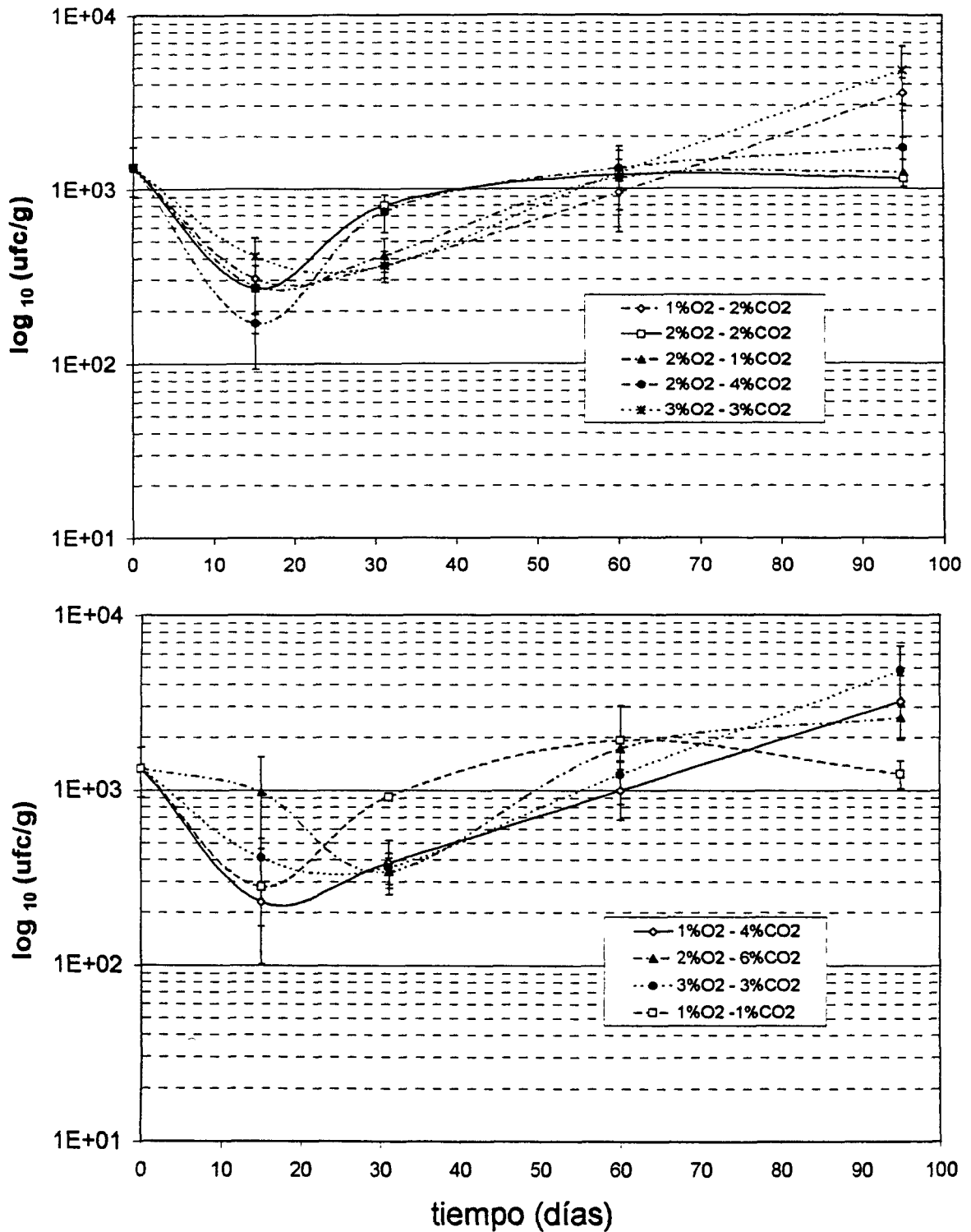


Figura 6: Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) (ufc/ml) crecida inicialmente en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l+urea 1,2 g/l y luego sobre la superficie de manzana "Golden Delicious" bajo condiciones de frigoconservación.

En condiciones de atmósfera 3 % O<sub>2</sub> - 3 % CO<sub>2</sub>, la cepa *C. sake* (CPA-1) presenta un buen crecimiento y adaptación, con un descenso en los primeros 15 días, después de los cuales aumenta, llegando a crecimiento más alto ( $4,83 \cdot 10^3$  ufc/g) que el resto de condiciones de frigoconservación.

En las condiciones de atmósfera de bajo oxígeno: 2 % O<sub>2</sub> - 2 % CO<sub>2</sub>, tras un descenso de la población en los primeros 15 días, presenta una buena adaptación pero un crecimiento bajo ( $1,14 \cdot 10^3$  ufc/g a los 95 días).

En las condiciones de atmósfera de 2 % O<sub>2</sub> - 4 % CO<sub>2</sub>; 2 % O<sub>2</sub> - 6 % CO<sub>2</sub>, y 2 % O<sub>2</sub> - 1 % CO<sub>2</sub> se observa que existe una buena adaptación del antagonista con una disminución del crecimiento en los primeros 15 días, y luego comienza a subir lentamente ( $1,71 \cdot 10^3$  ufc/g y  $2,6 \cdot 10^3$  ufc/g respectivamente a los 95 días), lo que nos indica que la cepa *C. sake* (CPA-1) tiene buena resistencia a altas concentraciones de CO<sub>2</sub>.

En condiciones de atmósfera de muy bajo oxígeno 1 % O<sub>2</sub> - 1 % CO<sub>2</sub>, 1 % O<sub>2</sub> - 2 % CO<sub>2</sub> y 1 % O<sub>2</sub> - 4 % CO<sub>2</sub> se observa una buena adaptación y crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) hasta los 60 días en que comienza a disminuir su crecimiento en 1 % O<sub>2</sub> - 1 % CO<sub>2</sub> y en tanto que en las atmósferas de 1 % O<sub>2</sub> - 2 % CO<sub>2</sub> y 1 % O<sub>2</sub> - 4 % CO<sub>2</sub> no hay una disminución del crecimiento a los 60 días, sino que más bien aumenta.

## **6. Optimización de costes del mejor medio de cultivo para la cepa *C. sake* (CPA-1).**

### **6.1. Análisis físico-químico de diferentes muestras de melaza de caña de azúcar.**

Según los resultados expuestos anteriormente, la melaza de caña de azúcar es la principal materia prima en la producción de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Presenta una composición variable de una muestra a otra, porque depende de varios factores, como por ejemplo el proceso que se ha utilizado en la extracción y purificación del azúcar (Ceijka, 1983; Reed y Nagodawithana, 1991).

Una vez establecido que el mejor medio de crecimiento para la cepa *C. sake* (CPA-1) es el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, tanto por su coste, método de preparación y producción de masa poblacional, se procede a realizar un análisis y comparación de las características físicas de varias muestras de melazas puras y del medio preparado, con el objetivo de determinar si hay gran diferencia o no entre las mismas, que pueda influir en el crecimiento del

antagonista.

Analizando los resultados obtenidos (Tabla 57), se observa que de las 16 muestras de melazas puras, los grados Brix se encuentran dentro de un rango de 66 a 86 con una media de 74,63. El pH no tiene gran variación y va de 4,4 a 5,4 con una media de 5.

Tabla 57: Crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en diferentes muestras de melaza de caña de azúcar en concentración de 40 g/l con urea 1,2 g/l

Nº MUESTRA	°BRIX	pH MELAZA	$a_w$ MELAZA	pH MEDIO	$a_w$ MEDIO	CRECIMIENTO(a)
1	76	4,7	0,766	5,0	0,983	9,22E+08
2	71	4,7	0,770	5,1	0,991	8,62E+08
3	75	4,6	0,748	4,9	0,998	8,60E+08
4	66	5,2	0,751	5,6	0,978	6,17E+08
5	76	5,4	0,723	5,7	0,982	7,35E+08
6	74	5,2	0,745	5,5	0,983	5,20E+08
7	74	5,2	0,745	5,8	0,991	4,63E+08
8	67	5,2	0,740	5,6	0,988	3,69E+08
9	76	5,3	0,745	5,8	0,982	4,12E+08
10	79	4,6	0,760	4,9	0,978	3,82E+08
11	86	4,6	0,726	4,8	0,990	6,50E+08
12	68	4,4	0,755	4,8	0,978	8,50E+08
13	76	5,4	0,721	5,5	0,984	9,20E+08
14	75	4,6	0,760	4,8	0,988	8,30E+08
15	81	5,3	0,717	5,5	0,991	5,93E+08
16	74	5,3	0,732	5,5	0,995	6,80E+08

(a): expresado en ufc/ml.

Nº MUESTRA.: número de muestra de melaza de caña de azúcar analizada, ° BRIX: valor de los grados Brix de la muestra de melaza de caña de azúcar,  $a_w$  MELAZA: actividad de agua de la melaza de caña de azúcar pura,  $a_w$  MEDIO: actividad de agua de la muestra melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

La  $a_w$  de las melazas puras igual que el pH no tiene una gran variación entre las muestras, siendo el valor más bajo 0,717 y el más alto 0,770, y su valor medio 0,744.

En relación a los parámetros analizados, se observa que no hay un amplio rango de variación.

Cuando se prepara el medio de crecimiento melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l con cada una de las muestras de melazas estudiadas y se analizan los mismos parámetros anteriores, se observa que el pH de los medios preparados es más básico comparado con la melaza pura por la adición de la urea, y va desde 4,8 a 5,8, con un promedio de 5,3, mientras la  $a_w$  varía de 0,978 a 0,998, con una media de 0,987.

Se inoculan los diferentes medios de cultivo con el antagonista y a continuación se analizan los resultados del crecimiento y se observa que en todas las muestras de melaza de caña de azúcar hay un buen crecimiento con una masa microbiana que va desde  $3,69 \cdot 10^8$  ufc/ml hasta  $9,22 \cdot 10^8$  ufc/ml. Por lo que se concluye que las diferentes muestras de melaza de caña de azúcar presentan similitud en sus características físicas y presentan un buen crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), ya que en todas las muestras no es inferior al exponente 8, resultados que están en concordancia con los obtenidos por Schaffler *et al.*, (1997) en cuanto a las variaciones químicas observadas en la composición de los diferentes azúcares de las melazas.

Los medio de melaza con urea preparados con las diferentes muestras de melaza presentan iguales actividades de agua pero diferentes crecimientos del antagonista, como se observa en una muestra con  $a_w$  0,978 que tiene un crecimiento de  $3,82 \cdot 10^8$  ufc/ml y otra muestra con la misma  $a_w$  que tiene un crecimiento de  $8,5 \cdot 10^8$  ufc/ml.

## **6.2. Crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio de melaza de caña de azúcar con urea y con diferentes concentraciones de inoculo.**

La concentración óptima del inoculo para la producción de microorganismos determina la velocidad y la producción final del microorganismo (Crueger y Crueger, 1993). Una vez determinado que existe similar y buen crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en varias muestras de melaza de caña de azúcar, se procede a analizar la influencia de la concentración del inoculo en la población final del antagonista y determinar la concentración de inoculo más adecuada que se debe sembrar en el medio de cultivo, para lo cual se procede a sembrar inoculos en concentraciones que van desde  $1 \cdot 10^2$  hasta  $1 \cdot 10^6$  ufc/ml.

Después de sembradas las diferentes concentraciones de inoculos en el medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l, se determina la concentración real del microorganismo en el medio, para lo cual se siembra una vez añadido el respectivo inoculo.

En todos los casos se observa (Tabla 58) una concentración del antagonista inferior al inoculo teórico.



**Tabla 58: Influencia de la concentración del inóculo en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l**

INOCULO TEÓRICO	pH INICIAL	pH FINAL	C.0 HORAS	C.39 HORAS
1,00E+02	5,03	5,37	6,00E+01	2,20E+07
1,00E+03	4,97	4,8	5,05E+02	2,43E+08
1,00E+04	4,97	4,7	5,90E+03	4,98E+08
1,00E+05	4,97	6,2	7,45E+04	5,91E+08
1,00E+06	4,97	6,6	6,30E+05	6,09E+08

C.0 HORAS: concentración del antagonista una vez inoculado en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

C.39 HORAS: 39 horas de crecimiento del microorganismo antagonista en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

Se somete a agitación en orbital a 150 rpm y después de 39 horas de crecimiento, se siembra nuevamente y se analizan los resultados, observándose que con la concentración de inóculo más baja, que es de  $1 \cdot 10^2$  ufc/ml, se obtiene el crecimiento más bajo de  $2,2 \cdot 10^7$  ufc/ml. También hay un crecimiento bajo con un inóculo inicial de  $1 \cdot 10^3$  ufc/ml ( $2,43 \cdot 10^8$  ufc/ml).

El resto de concentraciones iniciales de inóculos  $1 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^5$  y  $1 \cdot 10^6$  ufc/ml dan en el medio de cultivo melaza con urea buenos crecimientos y parecidos entre ellos, por lo que se determina que partiendo de un inóculo de  $1 \cdot 10^4$  ufc/ml de concentración inicial, se obtiene un buen crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

### **6.3. Determinación de la influencia del medio de crecimiento del cultivo estárter de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el crecimiento del microorganismo antagonista.**

El medio de cultivo apropiado del inóculo es vital para tener estárter o títulos óptimos en el proceso posterior a escala de producción industrial (Crueger y Crueger, 1993).

El inóculo del microorganismo antagonista que se utiliza, proviene de un cultivo estárter que puede haber crecido en un medio igual o diferente al medio en que se realizará el crecimiento a nivel de producción (Beudeker *et al.*, 1989; Reed y Nagodawithana, 1991).

El objetivo de esta parte es determinar la influencia del medio de crecimiento del inóculo en el crecimiento en fermentador de la cepa *C. sake* (CPA-1).

**Tabla 59: Influencia del crecimiento del inoculo en medios NYDB y melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en fermentador.**

<b>TIPO DE INOCULO</b>	<b>C. EN MEDIO MELAZA CON UREA</b>
Crecido en medio NYDB	3,1E+08
Crecido en medio M.c.U	2,9E+08

M.c.U.: medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

Se hace el crecimiento del inoculo del microorganismo antagonista en medio NYDB y melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, y luego se siembra en el medio de cultivo de melaza con urea que se encuentra en el fermentador (apartado 21 del capítulo de Material y Métodos).

En base a los resultados de la Tabla 59, podemos observar que tanto en medio NYDB como en medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l se obtienen crecimientos parecidos, es decir, que se puede preparar el inoculo o cultivo estándar o iniciador de la cepa *C. sake* (CPA-1) en los dos medios antes mencionados para la producción del antagonista en el medio de melaza 40 g/l con urea 1,2 g/l en fermentador.

#### **6.4. Influencia de la pureza de la fuente de nitrógeno en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el medio melaza de caña de azúcar con urea y melaza de remolacha azucarera con urea.**

La producción de la cepa *C. sake* (CPA-1) en fermentador en medio de melaza de caña azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, tiene como dos principales materias primas la melaza de caña de azúcar y la urea.

La melaza de caña de azúcar tiene un precio bajo (0,0148 pesetas/gramo) por lo que se puede utilizar a nivel industrial.

En caso de escasez de esta materia prima, por proceder de América, se tiene como medio alternativo a la melaza de remolacha azucarera (con un precio de 0,0146 pesetas/gramo), pero que no produce una población microbiana tan alta como la melaza de caña de azúcar (relación medio/medio melaza de caña de azúcar = 0,93).

La urea que se ha utilizado en todos los ensayos anteriores es de pureza de laboratorio con un 99 % pero su precio es elevado por lo que no es recomendable su uso a nivel industrial.

El objetivo de esta parte experimental es determinar la influencia de la pureza de la urea en la producción del antagonista.

Se realizan pruebas de crecimiento con urea pura del 99 % de pureza, urea cristalina del 98 % de pureza y urea técnica industrial de un 46 % de pureza, tanto en medio de melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera, y además con sulfato de amonio como segunda fuente de nitrógeno con muestras de un 99 % de pureza, 98 % de pureza y 90 % de pureza.

Analizando los resultados (Tabla 60) del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en melaza de caña de azúcar con urea, con tres grados de pureza, se puede decir que no existen apreciables diferencias; en el medio de melaza de caña de azúcar con urea 99 % de pureza, hay un crecimiento  $4,75 \cdot 10^8$  ufc/ml, y en el medio de melaza de caña de azúcar con urea cristalina 98 % de pureza, se obtiene el mismo crecimiento ( $4,79 \cdot 10^8$  ufc/ml). Mientras que la melaza de caña de azúcar con sulfato de amonio del 98 % de pureza como fuente de nitrógeno, se logra un crecimiento mas bajo ( $3,13 \cdot 10^8$  ufc/ml) e inferior al crecimiento en el mismo medio con sulfato de amonio 99 % de pureza ( $3,85 \cdot 10^8$  ufc/ml).

Tabla 60: Influencia del grado de pureza de la urea y del sulfato de amonio en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio de melaza de caña de azúcar.

COMPOSICIÓN (b)	pH INICIAL	pH FINAL	CRECIMIENTO(a)
M.c. 40 g/l+U.1,2 g/l (1)	4,9	5,3	4,75E+08
M.c. 40 g/l+U.1,2 g/l (2)	4,9	5,7	4,79E+08
M.c. 40 g/l+U.1,2 g/l (3)	5,0	5,5	4,68E+08
M.c. 40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l (4)	5,0	3,3	3,85E+08
M.c. 40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l (5)	5,0	3,3	3,13E+08
M.c. 40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l (6)	4,0	3,4	3,19E+08
M.r. 40 g/l+U.1,2 g/l (1)	6,8	6,3	2,38 E+08
M.r. 40 g/l+U.1,2 g/l (2)	6,8	6,7	2,28 E+08
M.r. 40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l (4)	6,7	5,1	2,78 E+08
M.r. 40 g/l+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,65 g/l (5)	6,7	5,3	2,81 E+08

(a): expresado en ufc/ml.

(b): M.c.: melaza de caña de azúcar, M.r.: melaza de remolacha azucarera, U.: urea, (1): urea pura, 99 % de pureza, (2): urea cristalina, 98 % de pureza, (3): urea técnica industrial, 46 % de pureza, (4): Sulfato de amonio puro 99 % de pureza, (5): Sulfato de amonio 98 % de pureza, (6): Sulfato de amonio 90 % pureza.

En base a resultados de anteriores experiencias de crecimiento, en el medio de melaza de remolacha azucarera con urea hay menor crecimiento del antagonista que en medio de melaza de caña de azúcar con urea, el cual es ligeramente inferior si se utiliza urea como fuente de nitrógeno

en lugar de sulfato de amonio, pero la pureza de la urea y del sulfato de amonio no influyen notoriamente en el crecimiento.

### **6.5. Estudio de precios de los diferentes medios utilizados para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

Después de haber analizado los diferentes crecimientos de la cepa *C. sake* (CPA-1) en varios medios inicialmente seleccionados por su composición nutritiva, se ha determinado que los mejores crecimientos se obtienen en:

- Medio germen de cebada 20 % peso/volumen, infusión.
- Medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.
- Medio de melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l y urea 1,2 g/l.

De los tres medios seleccionados, se procede a analizar cada uno de ellos desde el punto de vista económico y de facilidad de preparación para seleccionar el más adecuado para su utilización a nivel de producción industrial.

#### **6.5.1. Medio de germen de cebada 20 %.**

El medio de germen de cebada 20 % preparado por infusión es el medio simple que presenta el mejor crecimiento del antagonista con una relación medio/NYDB igual a 3,1.

Analizando desde el punto de vista económico, el germen de cebada es un subproducto de la germinación de la cebada para la fabricación de cerveza (raicillas), por lo que es una materia prima barata con un precio de 0,03 ptas./g y de fácil adquisición, pero presenta el inconveniente de la laboriosidad de preparación para medio de crecimiento, que se realiza por infusión y que a nivel industrial es complicado y laborioso, aumentando los costos de producción.

Otro punto que se debe tomar en cuenta es la concentración del medio. Se necesitan 200 g de germen de cebada por litro de medio, por lo que el precio del litro de medio germen de cebada aumenta a 6 pesetas.

En base a todo el análisis realizado, se descarta el mismo para ser utilizado en la producción de la cepa *C. sake* (CPA-1) a nivel industrial.

#### **6.5.2. Medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.**

El segundo medio simple donde se obtuvo el mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) fue el

medio de melaza de caña de azúcar 50 g/l con una relación medio/NYDB igual a 2,71. Para mejorar el medio se realizaron pruebas adicionales de suplementación con fuentes de nitrógeno, obteniéndose en el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l el mayor crecimiento con una relación medio/NYDB igual a 3,67.

Analizando desde el punto de vista económico, el precio del gramo de melaza de caña de azúcar es muy barato, de 0,0148 ptas./g, por ser un subproducto de la elaboración del azúcar a partir de la caña de azúcar.

Para la elaboración del medio de cultivo se requieren 40 g de melaza de caña de azúcar y 1,2 g de urea en estado puro, para un litro de medio, resultando entonces el precio del medio es de 2,97 ptas./l.

Para abaratar más el medio de crecimiento, se analizó la influencia de la pureza de la urea en el crecimiento del antagonista y se determinó que la urea con diferentes grados de pureza da crecimientos parecidos, siendo el precio del gramo de urea 99 % de pureza 2,9 ptas.

Se obtuvieron los mismos resultados en el medio de melaza de remolacha azucarera con urea con diferente grado de pureza, consiguiendo de esta manera abaratar el medio de cultivo, ya que el precio de la urea cristalina 98 % de pureza que dio buen crecimiento es de 0,74 ptas./g, por lo que el precio del litro de medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l cristalina 98 % de pureza es de 1,48 ptas./l y el precio del medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l cristalina 98 % de pureza es de 1,47 ptas./l.

Resumiendo todo lo antes expuesto, desde el punto de vista de preparación, el medio de melaza con urea es sencillo por lo que no influye en los costes de producción y la pureza de la urea tampoco influye en el crecimiento, reduciendo también el precio del medio. Concluyendo por tanto que el mejor medio para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es el constituido por melaza de caña de azúcar 40 g/l con 1,2 g/l de urea cristalina del 98 % de pureza.

### **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.**

El tercer medio simple donde se obtuvo un buen crecimiento fue el medio de melaza de remolacha azucarera 50 g/l con una relación medio/NYDB igual a 2,05. Igual que la melaza de caña de azúcar se mejora el crecimiento al suplementarlo con urea, obteniéndose un buen crecimiento en el medio melaza remolacha azucarera 70 g/l con urea 1,2 g/l con una relación medio/medio melaza de caña de azúcar igual a 0,96, es decir, que es ligeramente inferior que el medio de melaza de caña de azúcar con urea a iguales concentraciones. Analizando desde el punto de vista económico, el precio de la melaza de remolacha azucarera es de 0,0146 ptas./g.

Para mejorar el crecimiento se realizan pruebas adicionales de medio combinado de melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l, obteniéndose un ligero incremento en el crecimiento ( $7,53 \cdot 10^8$  ufc/ml) que el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l ( $7,41 \cdot 10^8$  ufc/ml), por lo que este medio es una buena alternativa, y desde el punto de vista económico el precio del medio de cultivo es igual (1,476 ptas./l con urea cristalina 98 % de pureza) que el medio de melaza de caña de azúcar con urea, el método de preparación es el mismo que el medio de melaza de caña de azúcar por lo que no se incrementan los costos de producción.

## **7. Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) como agente de biocontrol de podredumbres en manzanas “Golden Delicious”.**

Una vez determinada la capacidad antagónica de la cepa *C. sake* (CPA-1), se procede a realizar con ella, diferentes pruebas de efectividad, crecida en diferentes condiciones, para determinar su influencia en la capacidad antagónica.

### **7.1. Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en varios medios de cultivo.**

Una vez establecidas las mejores condiciones de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1); pH, temperatura, medio de crecimiento más económico y mejor tiempo de crecimiento, el objetivo de esta parte experimental es realizar pruebas comparativas de efectividad del antagonista entre varios de estos medios de cultivo como son : melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l y NYDB, en el control de la podredumbre de *P. expansum*, en manzana “Golden Delicious” (del apartado 22.1.3 del capítulo de Material y Métodos).

Analizando los resultados de la Tabla 61 observamos que en todos los casos no hay en todos medios de crecimiento estudiados diferencias significativas de efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) tanto en diámetro de podredumbre como en porcentaje de orificios podridos, es decir, el antagonista presenta la misma efectividad, crecida en cualquiera de los cuatro medios utilizados.

Tabla 61: Efectividad comparativa de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en varios medios de cultivo.

MEDIO(a)	Ø PODREDUMBRE(b)		% ORIFICIOS PODRIDOS(c)	
	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml
CK	2,48 a	2,48 a	100 a	100 a
M.c.U.40	0,72 b	1,50 b	58,3 b	91,7 b
M.r.U.40	0,80 b	1,42 b	66,7 b	83,3 b
M.c.U.20 M.r.U.20	0,89 b	1,27 b	62,5 b	83,3 b
NYDB	0,99 b	1,28 b	75 b	87,5 b

(a): medios de cultivo donde crece la cepa *C. sake* (CPA-1) que son M.c.U.40: Melaza de caña de azúcar 40 g/l urea 1,2 g/l; M.r.U.40: Melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l; M.c.U.20 M.r.U.20: Melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l; NYDB. medio NYDB y CK: control (no tiene antagonista sino sólo el patógeno).

(b): El diámetro de podredumbre corresponde a la media de 24 diámetros de podredumbre de cada tratamiento (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una), es medida en centímetros, en los que se ha inoculado la cepa *C. sake* (CPA-1) en unas concentraciones de 2.10<sup>7</sup> ufc/ml y 2.10<sup>6</sup> ufc/ml. *P. expansum* a una concentración 1.10<sup>4</sup> conidios/ml.

(c): El % orificios respecto al total de 24 orificios (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una).

Los tratamientos de cada columna que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes, utilizando el test de rango múltiple de Duncan en que las diferencias significativas fueron juzgadas en el nivel  $p < 0.05$ .

En todos los medios, el antagonista reduce de forma significativa el daño producido por *P. expansum*.

Al comparar la efectividad en función de la concentración del antagonista, la concentración 2.10<sup>7</sup> ufc/ml es más efectiva; aproximadamente un 30 % más que la concentración 2.10<sup>6</sup> ufc/ml.

La cepa *C. sake* (CPA-1), crecida en medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, a la concentración de 2.10<sup>7</sup> ufc/ml, reduce en un 72 % el diámetro de podredumbre de *P. expansum*, respecto al control (sin antagonista).

## 7.2. Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medios con diferentes actividades de agua ( $a_w$ ).

Las levaduras acumulan en sus células, polihidroxi-alcoholes (polioles) como glicerol, eritritol, arabitol y manitol, al ser sometidas a condiciones de estrés como el crecimiento a baja actividad de agua (Hocking, 1986; Ellis *et al.*, 1991; Teixidó 1997, 1998a, 1998b), lo que puede estimular su germinación conidial (Hallsworth y Magan, 1994a, 1995, 1996), y mejorar la capacidad antagónica (Pascual *et al.*, 1996; Teixidó 1997, 1998a, 1998b).

En un primer ensayo se pretende determinar la influencia del aumento de la concentración de las

melazas en el medio de crecimiento, con la consiguiente disminución de su  $a_w$  en la efectividad del antagonista en el control de la podredumbre de *P. expansum*, en manzana “Golden Delicious”, para lo cual se utilizan cepas de antagonista crecidas en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l  $a_w$  0,998, melaza de caña de azúcar 250 g/l con urea 1,2 g/l con  $a_w$  0,972, melaza de caña de azúcar 350 g/l con urea 1,2 g/l con  $a_w$  0,968, medios de melaza de remolacha azucarera con urea a las mismas concentraciones y  $a_w$  y medio NYDB  $a_w$  0,998 (apartado 22.1.1 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 62: Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medios de diferentes  $a_w$  modificadas con melaza.

MEDIO(a)	Ø PODREDUMBRE(b)		% ORIFICIOS PODRIDOS (c)	
	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml
CK	2,42 a	2,42 a	100 a	100 a
M.c.U.40	0,85 de	1,52 bc	70 cd	96,7 a
M.c.U.250	1,33 b	1,65 b	96,7 ab	100 a
M.c.U.350	1,15 bcd	1,7 b	83,3 abc	93,3 ab
M.r.U.40	0,57 e	1,67 b	56,7 d	96,7 a
M.r.U.250	1,2 bc	1,09 d	86,7 abc	83,3 b
M.r.U.350	0,98 cd	1,23 cd	80 abc	96,7 a
NYDB	0,98 cd	1,48 bc	76,7 bc	96,7 a

(a): medios de cultivo donde crece la cepa *C. sake* (CPA-1) que son: M.c.U.40: Melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; M.c.U.250: Melaza de caña de azúcar 250 g/l con urea 1,2 g/l; M.c.U.350: Melaza de caña de azúcar 350 g/l con urea 1,2 g/l; M.r.U.40: Melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l; M.r.U.250: Melaza de remolacha azucarera 250 con urea 1,2 g/l; M.r.U.350: Melaza de remolacha azucarera 350 g/l con urea 1,2 g/l; NYDB. medio NYDB y CK: control (no tiene antagonista sino sólo el patógeno).

(b): El diámetro de podredumbre corresponde a la media de 24 diámetros de podredumbre de cada tratamiento (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una), es medida en centímetros, en los que se ha inoculado la cepa *C. sake* (CPA-1) en una concentración de 2.10<sup>7</sup> ufc/ml y 2.10<sup>6</sup> ufc/ml, *P. expansum* a una concentración 1.10<sup>4</sup> conidos/ml.

(c): El % orificios respecto al total de 24 orificios (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una).

Los tratamientos de cada columna que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes, utilizando el test de rango múltiple de Duncan en que las diferencias significativas fueron juzgadas en el nivel  $p < 0.05$ .

La cepa *C. sake* (CPA-1) a la concentración de 2.10<sup>7</sup> ufc/ml, crecida en medio melaza remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 con  $a_w$  0,998, tiene mayor efectividad en la reducción del diámetro de podredumbre que la crecida en los medios ensayados, con una reducción del 76 % pero es estadísticamente igual a la efectividad de la cepa crecida en el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

En relación al porcentaje de orificios podridos, se confirman los resultados de efectividad



obtenidos en diámetro de podredumbre, habiendo una mayor efectividad en medio de melaza remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, pero es equivalente estadísticamente a la efectividad en medios de melaza de caña de azúcar 40 g/l y NYDB.

A partir de los resultados obtenidos, podemos decir que la cepa *C. sake* (CPA-1), reduce su efectividad si crece en medios de melaza con  $a_w$  modificadas también con melazas, aunque mantiene una significativa capacidad antagonista.

El objetivo de la segunda parte de esta experiencia es establecer comparaciones en la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, con  $a_w$  0,998, NYDB con  $a_w$  0,964 modificada con glicerol, NYDB  $a_w$  0,96 modificada con glucosa y NYDB sin modificar su  $a_w$  ( $a_w$  0,998) en el control de la podredumbre de *P. expansum* en manzana "Golden Delicious". La prueba se realiza siguiendo la metodología del apartado 22.1.2 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 63: Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medio de melaza de caña de azúcar con urea y en medio NYDB con diferentes  $a_w$ .

MEDIO( a)	Ø PODREDUMBRE (b)	% ORIFICIOS PODRIDOS(c)
M.c.U.40	0,25 b	33,3 c
NYDB glucosa	0,72 b	61,1 bc
NYDB glicerol	0,73 b	72,2 ab
NYDB	0,39 b	44,5 bc
CK	2,25 a	100 a

(a): medios de cultivo donde crece la cepa *C. sake* (CPA-1) que son: M.c.U.40: Melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; NYDB glucosa: medio NYDB modificada su  $a_w$  a 0,96 con glucosa; NYDB glicerol: medio NYDB modificada su  $a_w$  a 0,964 con glicerol; NYDB. medio NYDB y CK: control (no tiene antagonista sino sólo el patógeno).

(b): El diámetro de podredumbre corresponde a la media de 24 diámetros de podredumbre de cada tratamiento (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una), es medida en centímetros, en los que se ha inoculado la cepa *C. sake* (CPA-1) en una concentración de  $2.10^7$  ufc/ml y *P. expansum* a una concentración  $1.10^4$  conidios/ml.

(c): El % orificios respecto al total de 24 orificios (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una).

Los tratamientos de cada columna que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes, utilizando el test de rango múltiple de Duncan en que las diferencias significativas fueron juzgadas en el nivel  $p < 0.05$ .

Analizando los resultados de la Tabla 63, observamos que la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1), en el control de *P. expansum*, es la misma, independientemente del medio en que haya crecido, ya que los valores obtenidos son estadísticamente iguales, aunque en todos los casos son superiores al testigo sin antagonista.

En el caso de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, se consigue un porcentaje de

reducción del 75 % en diámetro de podredumbre y de un 68 % en porcentaje de orificios podridos.

Los resultados de este estudio no confirman los obtenidos por Teixidó (1997, 1998b), la cual indica que la cepa *C. sake* (CPA-1), crecida en medio NYDB modificada con glucosa para bajar su  $a_w$ , tenía mejor capacidad de control de *P. expansum* que la crecida en NYDB sin modificar su  $a_w$ .

Por lo tanto es conveniente realizar estudios y ensayos más detallados en este campo de trabajo.

### **7.3. Efecto del tiempo de crecimiento en la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medio de melaza de caña de azúcar con urea.**

El objetivo de la presente parte experimental es determinar la influencia de las horas de crecimiento del antagonista sobre la efectividad en el control de *P. expansum*, en manzana "Golden Delicious", para lo cual se producen poblaciones de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecidas en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, a los tiempos de 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 horas, y otras crecidas en medio NYDB a los tiempos de 24, 36 y 48 horas (apartado 22.1.4 del capítulo de Material y Métodos).

Analizando los resultados de la Tabla 64 observamos que la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) a diferentes horas de crecimiento en medio NYDB es estadísticamente igual en todos los casos, mientras que en medio de melaza de caña de azúcar, las poblaciones de 40 y 44 horas de crecimiento presentan menor efectividad que la crecida a 24 horas, lo cual redujo el diámetro de podredumbre respecto al control en un 70 %.

Por lo que se puede determinar que las horas de crecimiento del antagonista no influyen de forma muy significativa en la mejora de la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1), aunque parece apreciarse una tendencia de descenso de la efectividad a medida que se incrementa el número de horas de crecimiento.

Tabla 64: Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medio de melaza de caña de azúcar con urea y en medio NYDB a diferentes horas de crecimiento.

MEDIO(a)	Ø PODREDUMBRE(b)	% ORIFICIOS PODRIDOS(c)
CK	2,59 a	100 a
M.c.U.24 h.	0,30 d	29,2 c
M.c.U.28 h.	0,50 cd	37,5 c
M.c.U.32 h.	0,64 bcd	37,5c
M.c.U.36 h.	0,41 cd	37,5 c
M.c.U.40 h.	1,01 bc	62,5 c
M.c.U.44 h.	1,26 b	87,5 ab
M.c.U.48 h.	0,48 cd	37,5 c
NYDB 24 h.	0,46 cd	33,3 c
NYDB 36 h.	0,67 bcd	54,17 c
NYDB 48 h.	0,98 bc	62,5 bc

(a): medios de cultivo donde crece la cepa *C. sake* (CPA-1) que son: M.c.U.24 h, M.c.U.28 h, M.c.U.32 h, M.c.U.36 h, M.c.U.40 h, M.c.U.44 h, M.c.U.48 h: Melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l a las 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 horas de crecimiento respectivamente; NYDB 24 h, NYDB 36 h, NYDB 48 h: medio NYDB a las 24, 36 y 48 horas de crecimiento y CK: control (no tiene antagonista sino sólo el patógeno).

(b): El diámetro de podredumbre corresponde a la media de 24 diámetros de podredumbre de cada tratamiento (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una), es medida en centímetros, en los que se ha inoculado la cepa *C. sake* (CPA-1) en una concentración de  $2 \cdot 10^7$  ufc/ml y *P. expansum* a una concentración  $1 \cdot 10^4$  conidios/ml.

(c): El % orificios respecto al total de 24 orificios (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una).

Los tratamientos de cada columna que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes, utilizando el test de rango múltiple de Duncan en que las diferencias significativas fueron juzgadas en el nivel  $p < 0.05$ .

#### 7.4. Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) en un ensayo a temperatura de conservación frigorífica.

Este ensayo a mediana escala, pretende imitar al máximo posible las condiciones de temperatura y humedad relativa a las que estaría sometido el microorganismo antagonista aplicado en una central hortofrutícola, para poder determinar así las perspectivas de su aplicación comercial.

Se compara la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1), crecida en medios: melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l, y NYDB, en el control de la podredumbre de *P. expansum*, en manzana "Golden Delicious" mantenida un mes en condiciones de frigoconservación (apartado 22.1.5 del capítulo de Material y Métodos).

Tabla 65: Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medios de melazas, sobre manzana "Golden Delicious" en condiciones de frigoconservación.

MEDIO(a)	Ø PODREDUMBRE(b)		% ORIFICIOS PODRIDOS(c)	
	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml
CK	0,80 a	0,80 a	83,3 a	83,3 a
M.c.U.40	0,09 b	0,33 b	15 b	40 b
M.r.U.40	0,14 b	0,29 ba	20 b	35 b
M.c.U.20.M.r.U.20	0,21 b	0,23 b	28,3 b	31,7 b
NYDB	0,06 b	0,35 b	11,67 b	40 b

(a): medios de cultivo donde crece la cepa *C. sake* (CPA-1) que son M.c.U.40: Melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; M.r.U.40: Melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l; M.c.U.20.M.r.U.20: Melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l; NYDB. medio NYDB y CK: control (no tiene antagonista sino sólo el patógeno).

(b): El diámetro de podredumbre corresponde a la media de 60 diámetros de podredumbre de cada tratamiento (3 repeticiones de 10 frutas con dos orificios cada una), es medida en centímetros, en los que se ha inoculado la cepa *C. sake* (CPA-1) en una concentración de 2.10<sup>7</sup> ufc/ml. 2.10<sup>6</sup> y *P. expansum* a una concentración 1.10<sup>4</sup> conidios/ml.

(c): El % orificios respecto al total de 24 orificios (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una).

Los tratamientos de cada columna que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes, utilizando el test de rango múltiple de Duncan en que las diferencias significativas fueron juzgadas en el nivel  $p < 0.05$ .

Analizando los resultados obtenidos en la Tabla 65 se puede establecer que la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) sobre manzana "Golden Delicious", tras 30 días de conservación a 1 °C, es la misma, tanto si es crecida en medio de melaza de caña de azúcar, como en medio de melaza de remolacha azucarera como en la mezcla de las dos melazas como en NYDB.

El antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar muestra un buen nivel de control (15 % de orificios podridos) que es estadísticamente igual a la crecida en medio melaza de remolacha azucarera (20 % de orificios podridos) y mezcla de las dos melazas (28 % de orificios podridos).

La efectividad del antagonista no es significativamente menor en concentraciones bajas (2.10<sup>6</sup> ufc/ml) en el medio de melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, ya que se observan buenos niveles de control sobre la podredumbre del *P. expansum*.

Una vez establecido en la experiencia anterior, que la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1), es igual en todos los medios ensayados.

El objetivo de la segunda parte de este ensayo a mediana escala es el realizar pruebas de efectividad en las condiciones a las que estaría sometido el microorganismo antagonista aplicado en una central hortofrutícola en dos meses de frigoconservación, para poder determinar el tiempo

máximo en que existe una buena efectividad del antagonista, con perspectivas de su aplicación comercial.

Se realiza esta prueba siguiendo la metodología del apartado 22.1.6 del capítulo de Material y Métodos.

Tabla 66: Efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medio de melaza de caña de azúcar con urea, sobre manzana "Golden Delicious" en condiciones de frigoconservación.

MEDIO(a)	Ø PODREDUMBRE(b)		%ORIFICIOS PODRIDOS(c)	
<b>30 DIAS DE FRIGOCONSERVACIÓN</b>				
	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml
M.c.U.40	0,05 b	0,24 b	5 b	18,3 b
M.r.U.40	0,06 b	0,04 b	21,7 b	5 b
CK	0,97 a	0,97 a	60 a	60 a
<b>60 DÍAS DE FRIGOCONSERVACIÓN</b>				
	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml	2.10 <sup>7</sup> ufc/ml	2.10 <sup>6</sup> ufc/ml
M.c.U.40	1,17 b	2,15 b	36,7 b	61,7 b
M.r.U.40	1,17 b	1,56 b	46,7 b	53,3 b
CK	3,64 a	3,64 a	95 a	95 a

(a): medios de cultivo donde crece la cepa *C. sake* (CPA-1) que son M.c.U.40: Melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; M.r.U.40: Melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l; NYDB: medio NYDB y CK: control (no tiene antagonista sino sólo el patógeno).

(b): El diámetro de podredumbre corresponde a la media de 24 diámetros de podredumbre de cada tratamiento (3 repeticiones de 4 frutas con dos orificios cada una), es medida en centímetros, en los que se ha inoculado la cepa *C. sake* (CPA-1) en una concentración de 2.10<sup>7</sup> ufc/ml y *P. expansum* a una concentración 1.10<sup>4</sup> conidios/ml.

(c): El % orificios respecto al total de 60 orificios (3 repeticiones de 10 frutas con dos orificios cada una).

Los tratamientos de cada columna que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes, utilizando el test de rango múltiple de Duncan en que las diferencias significativas fueron juzgadas en el nivel p<0.05.

Se realiza la primera lectura de los resultados, tras 30 días de ser sometida la manzana a condiciones de frigoconservación.

La cepa *C. sake* (CPA-1) muestra en base a los resultados obtenidos (Tabla 66) un buen nivel de control, que es estadísticamente igual tanto si es crecida en medio de melaza de caña de azúcar con urea (5 % de orificios podridos), como en medio de melaza de remolacha azucarera con urea (21 % de orificios podridos), pero muy superior al control (60 % de orificios podridos).

Si la misma fruta se mantiene por 30 días más (total 60 días) bajo las mismas condiciones de frigoconservación, continúa manteniéndose buenos niveles de control, como se observa en la cepa crecida en medio de melaza de caña de azúcar (36 % de orificios podridos) siendo un poco inferior a pesar de ser estadísticamente iguales en el medio de melaza de remolacha azucarera (46 % de orificios podridos), y también superior al control (95 % de orificios podridos).

En la mayoría de los resultados tanto de los 30 días como de los 60 días de frigoconservación, se observa que el incremento de la concentración de la cepa *C. sake* (CPA-1) que se inocula de  $2.10^7$  ufc/ml,  $2.10^6$  ufc/ml, no mejora notoriamente el control, ya que a una concentración de  $2.10^6$  ufc/ml, se mantiene un buen nivel de control de podredumbre en la fruta, dato que tiene mucho interés a nivel de su utilización comercial.

### 7.5. Determinación de la calidad y madurez de la fruta utilizada para las pruebas de efectividad.

A pesar de que el estudio del estado de madurez de la fruta utilizada para las experiencias no es uno de los objetivos del presente trabajo, en este caso es importante ya que es un factor que se debe tener en cuenta para poder determinar la influencia que la calidad de la fruta en las pruebas de efectividad del microorganismo antagonista.

Tabla 67: Resultados de los índices de madurez de la manzana "Golden Delicious" ensayada. Se incluyen los resultados de las partidas de fruta de dos campañas.

TIPO DE FRUTA	CAMPAÑA	PESO (g)	DIÁMETRO (cm)	DUREZA (kg/cm <sup>2</sup> )	SÓLIDOS SOLUBLES (°Brix)	ACIDEZ (g.ác.málic/l)
Golden D. 1	96-97	208,5	8,1	7,2	12,9	6,39
Golden D. 2	97-98	185,9	7,7	6,4	13,2	6,21
Golden D. 3	97-98	224,9	8,4	6,2	12,9	5,23

Factor que puede influir en la efectividad del microorganismo antagonista *C. sake* (CPA-1) crecido en medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l.

En la tabla 67 se detallan los resultados de los parámetros de madurez de los diferentes lotes de manzana "Golden Delicious" utilizadas a lo largo de los dos años de ensayos.

Los resultados detallados a pesar de sus variaciones, indican que todas ellas tienen parámetros de madurez aceptables (Tabla 2 de materiales) para la realización de los ensayos correspondientes.



# ***Conclusiones***

---



## CONCLUSIONES

1. El germen de cebada es, de los subproductos agroalimentarios estudiados, el mejor medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *Candida sake* (CPA-1). Pero presenta el inconveniente de la mayor laboriosidad en su preparación y superior coste económico.
2. Las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera son los mejores subproductos agroalimentarios ensayados, por su bajo coste, fácil preparación y elevado crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).
3. La combinación de subproductos agroalimentarios no mejora de forma apreciable el alto crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) obtenida en los mejores medios simples.
4. La mayor producción de la cepa *C. sake* (CPA-1) se ha obtenido en el medio de cultivo melaza caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l, a una temperatura entre 24 y 26 °C y en un intervalo de tiempo entre 40 y 42 h. En estas condiciones la cepa presenta una alta efectividad en el control de *Penicillium expansum* en manzanas “Golden Delicious”.
5. La cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en los medios de cultivo de melazas, presenta un buen crecimiento en el rango de pH de 3 a 9, utilizando como sustancia tamponante el ácido cítrico y el hidrógeno fosfato de sodio.
6. La mínima actividad de agua que permite un buen crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es de 0,97. Esta actividad de agua se alcanza en un medio de 350 g/l de melaza de caña de azúcar y 1,2 g/l de urea. En estas condiciones la cepa presenta una alta efectividad en el control de *P. expansum* en manzanas “Golden Delicious”.
7. En el estudio de la evolución de la población de la cepa *C. sake* (CPA-1) en la superficie de manzanas “Golden Delicious” conservada a 1 °C de temperatura y a diferentes condiciones de atmósfera controlada, se detecta una importante disminución de la misma en los primeros 15 días, aumentando la población de forma considerable a partir de ese momento. No se observan diferencias apreciables entre las distintas condiciones ensayadas.
8. La alta efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el control del *P. expansum* no se ve modificada en función de la fase de crecimiento en que se determina su efectividad.
9. Todas las muestras de melaza de caña de azúcar estudiadas muestran similitud en cuanto a sus características físicas, y en todas ellas, la cepa *C. sake* (CPA-1) presenta un alto crecimiento no inferior a  $10^8$  ufc/ml.

10. La utilización de la urea del 98 % de pureza (0,74 ptas/g), en lugar de la urea 99% de pureza (2,9 ptas/g) en el medio de cultivo de melaza caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l, no da lugar a diferencias en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).
11. A partir de una concentración inicial de  $1 \cdot 10^4$  ufc/ml, en el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l, se obtienen producciones de la cepa *C. sake* (CPA-1) del orden de  $4,9 \cdot 10^8$  ufc/ml, observándose que al aumentar la concentración inicial en el medio de cultivo, no se supera el exponente 8 de crecimiento.
12. El medio de cultivo de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea (98% de pureza) 1,2 g/l es el mejor de los ensayados, en cuanto a producción de la cepa *C sake* (CPA-1) ( $4,7 \cdot 10^8$  ufc/ml) y coste (1,48 ptas/l).



# ***Bibliografía***

---

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMIC, E.B. 1977. Cebada y malteo. En *El cervecero en la práctica*. H.M. Broderick *et al.* (eds.) Impressions, Inc., Madison, Wisconsin, p. 29-52.
- ADAMS, P.B. y AYERS, W.A. 1979. Ecology of Sclerotinia species. *Phytopathology*, 69: 896-899.
- AHARONI, Y., COPEL, A. y FALLIK E. 1993. Hinokitiol ( $\beta$ -thujaplicin), for postharvest decay control on "Galia" melons. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.*, 21: 165.
- AMADOR, J. 1996. *Millora de la Capacitat antagonica de la soca (CPA-1) de Candida sake en el control de Penicillium expansum en post-collita de fruita de llavor*, 87 pp.
- AMERINE, M.A. y THOUKIS, G. 1958. The glucose-fructose ratio in California grapes. *Vitis*, 1: 224-229.
- ANAND, J.C. y BROWN, A.D. 1968. Growth patterns of the so-called osmophilic and nonosmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.*, 52: 205.
- ANDRE, L., NILSSON, A. y ADLER, L. 1988. The role of glycerol in osmotolerance of the yeast, *Debaryomyces hansenii*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 669.
- ANDREWS, J.H. 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. En *Biological Control on the Phylloshere*. Windels, C.E. y Lindow, S.E. (eds.). American Phytopathol. Soc. St. Paul, MN, USA. p. 31-44.
- ANDREWS, J.H., KENERLEY, C.M. y NORDHEIM, E.V. 1980. Positional variation in phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. *Microb. Ecol.*, 6: 71-84.
- ARRAS, G. 1993. Inhibition of postharvest fungal pathogen by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. *Adv. Hort. Sci.*, 7: 123.
- ARTES, F. 1994. Tratamientos térmicos y gaseosos alternativos a los tratamientos químicos postcosecha. *Fruticultura profesional*, 66: 36-43.
- ARTES, F. 1995. Innovaciones en los tratamientos físicos para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la post recolección. I Pretratamientos térmicos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los alimentos*, 35: 45-64.
- ARUL, J. 1994. Emerging technologies for the control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. En *Biological Control of Diseases and vegetables*. Wilson, Ch.L. y Winiewski, M.E. (eds.). CRC Press Inc., Boca Raton FL, USA. 1-10.
- BAKER, K.F. y COOK, R.J. 1974. Biological control of Plant Pathogen. Freeman, W.H. y Co.(eds.), San Francisco. CA. USA. 443 pp.
- BANAT, I.M. y MARCHANT, R. 1995. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. *World J. Microb. Biot.*, 11: 304-306.
- BANAT, I.M., NIGAM, P. y MARCHANT, R. 1992. The isolation of thermotolerant fermentative yeasts capable of growth at 52 °C and ethanol production at 45 °C and 50 °C. *World J. Microbi. Biot.*, 8: 259-263.
- BANNERJEE, M., DEDNATH, S. y MAJUMDAR, S. 1988. Production of ethanol from starch by direct fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 32: 831-834.
- BARILLERE, J.M., BIDAN, P. y DUBOIS, C. 1983. Thermal resistance of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine (French). *Bull. de l'OIV*, 56: 327-351.
- BARLOW, F. 1985. Chemistry and formulation. En *Pesticide application: principles and practice*. Haskell, P.T.

- (Eds.). Clarendon Press, Oxford, p. 1-34.
- BARNETT, J.A. 1968. Biochemical differentiation of taxawith special reference to the yeasts. En *The Fungi*. Vol 3. Ainsworth G.C., Susman A.S. (eds.) Academic Press, London, p. 557-595.
- BARNETT, J.A. 1976. The utilization of sugar by yeasts. *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, 32: 125-234.
- BARNETT, J.A. 1977a. *A guide to identifying and classifying yeast*. Cambridge University Press. New York, 1100 pp.
- BARNETT, J.A. 1977b. The nutritional test in yeast systematics. *J. Gen. Microbiol.*, 99: 183-190.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. y YARROW, D. 1990. *Yeasts. Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, 1002 pp.
- BELL, G.H. 1971. Action of monocarboxylic acid on *Candida tropicalis* growing on hidrocarbon substrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37: 385-400.
- BENITEZ, T., GASENT-RAMIREZ, J.M., CASTREJON, F. y CODON, A.C. 1996. Development of new strains for the food industry. *Biotechnol. Prog.*, 12: 149-163.
- BERGANDER, E. 1969. The effect of various fermentation inhibitors in molasses. *Lebensm. Industrie*, 16: 219-221.
- BERRIE, A.M. 1992. Alternative strategies for the control of post harvest rots in apples and pears. *Brighton Crop Protection Conference. Pests and diseases*, 15:301-309
- BERTRAND, A., DUBERNET, O.M. y RIBEREAU-GAYON. 1975. Trehalose, the principal disaccharide in wine (French). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 29: 220.
- BEUDEKER, R.F., VAN DAM, H.W., VAN DER PLAAT, J.B. y VELLENGA, K. 1989. Developments in baker's yeast production. En *Yeast. Biotechnology and biocatalysis*. Verachtert, H. y De Mot, R. (eds.) Marcel Dekker Inc. New York, p.103-146.
- BHATT, D.D. y VAUGHAN, E.K. 1963. Inter-relationships among fungi associated with strawberries in Oregon. *Phytopathology*, 53: 217-220.
- BIGGS, A.R. 1995. Detection of latent infection in apple fruit with paraquat. *Plant. Dis.*, 79: 1062-1067.
- BILINSKI, C.A., RUSSELL, J. y STEWARD, G.G. 1986. Anallysis of sporulation in brewers' yeast: induction of tetrad formation. *J. Institute Brew.*, 92: 594-598.
- BIRD, L.S., LIBERMAN, C., PERCY, R.G. y BUSH, D.L. 1979. The mechanism of multi-adversity resitance in cotton: theory and results. *Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., Cotton Dis. Counc.*, 39: 226-228.
- BISSON, J., DAULNY, J. y BERTRAND, A. 1980. Effect of fermentation temperature on the composition of white table wine. *Conn. Vigne. Vin.*, 14: 195-202.
- BIZEAU, C., MOREAU, C., MICHEL, P. y PONCHANT, D. 1990. Microflore fungique de la carposphère de pommes à cidre. *Cryptogamie Micol.*, 11: 1-12.
- BLAKEMAN, J.P. 1981. *Microbial Ecology of the Phylloplane*. Academic Press. London, 562 pp.
- BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. En *Biological Control on the Phylloplane*. Windels, C.E. y Lindow, S.E. (eds.). American Phytopathological Soc. St. Paul MN, USA., p. 6-30.
- BLAKEMAN, J.P. 1991. Foliar bacterial pathogenic: epiphytic growth and interactions on leaves. *J. Appl. Bact. Symposium*, 70: 49S-59S.
- BLAKEMAN, J.P. y BRODIE, D.S. 1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. En

- Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson, C.H y Preece, T.F. (eds.). Academic Press, London, p.529-557.
- BLAKEMAN, J.P. y FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 20: 167-192.
- BOEKHOUT, T. y KURTZMAN, C.P. 1996. Principles and methods used in yeast classification and an overview of currently accepted yeast general. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Wolf, K. (ed.). Editorial Espringer, Berlin, p. 1-82.
- BORZANI, W. 1996. Short note: Ethanol yields during the feeding phase in fed-batch fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. *World J. of Microbiol. Biot.*, 12: 415-416.
- BOURGEOIS, C.M. y LARPENT, J.P. 1994. Fermentaciones alimentarias. En *Microbiología alimentaria*. Vol 2. Ed. Acribia. 363 pp.
- BOWEN, J.F. y BEECH, F.W. 1967. Yeast flora of cider factories. *J. Appl. Bact.*, 30: 475-483.
- BRIDSON, E.Y. y BREKER, A. 1987. Desing and formulation of microbial culture media.
- BRIGGS, D.E., HOUHG, J.S., STEVENS, R. y YOUNG, T.W. 1991. Malting and brewing science. Vol 1. 2ª Ed. Chapman & Hall, London, 387 pp.
- BRODIE, I.D.S. y BLAKEMAN, J.P. 1976. Competition for exogenous substrates "in vitro" by leaf surface microorganisms and germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 227-239.
- BRONN, W.K. 1985. Investigations of the technological and economical possibility of using raw materials other than molasses for yeast production. Research Report T 85-117. Ministry for Science and Technology, German Federal Republic.
- BROWN, A.D. 1974. Microbial water relations: Features of the intracellular composition of sugar-tolerant yeasts. *J. Bacteriol.*, 118: 769-777.
- BROWN, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microbial Physiol.*, 17: 181.
- BRUINSMA, B.L y NAGODAWITHANA, J. 1987. Functional (bread making) properties of a nex yeast. *Cereal Chem.*, 58: 477-480.
- BURROWS, S. 1970. Baker's yeast. En *The Yeast*. Vol 3. Rose, A. H. y Harrison, J. S (eds.). Academic Press, New York, 645 pp.
- CAILLIET-ETHUIN, P., DUyme, F., TONON, F., JEANFILS, J. y DE CONINCK, J. 1998. Optimisation of *Tetrahymena rostrata* growth using food by-products as nitrogen source. *Biotechnol. Tech.*, 12: 177-181.
- CAMPBELL, I. 1970. Comparison of serological and physiological classification of genus *Saccharomyces*. *J. Gen Microbiol.*, 63: 189-198
- CAMPBELL, R. 1987. *Ecología microbiana*. Ed. Limusa. México. 268 pp.
- CEIJKE, A. 1983. Preparation of media. En *Biotechnology*. Vol. 3. Dellweg, H. (ed.). VCH. Publishing Company, Weinheim, West Germany, 430 pp.
- CELLIGOI, M.A.P.C., ANGELIS, D.F. y BUZATO, J.B. 1997. Application of sugar-cane molasses in the production of lipids by yeast. *Arq. Biol. Technol.*, 40: 693-698.
- CLARK, P. LUBS, L. 1916. Cuantitative Inorganic Analysis En *Biochemical Research*. Dawson, R., et al., (Eds.)Ed. Oxford Scientific Publishers, p 868-872.
- COOK, R.J y BAKER, K.F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathol. Soc. St. Paul, MN, USA. 539 pp.

- COOK, R.J. 1982. Progress toward biological control of plant pathogen with special reference to take-all of wheat. *Agric. For. Bull.*, 5:22.
- COOK, R.J. y PAPENDICK, R.I. 1978. Role of water potential in microbial growth and development of plant disease, with special reference to postharvest pathology. *HortScience*, 13: 559-564.
- CRUEGER, W. y CRUEGER, A. 1993. *Biotechnología: manual de microbiología industrial*. Editorial Acribia, Zaragoza, 413 pp.
- CULLEN, D. y ANDREWS, J.H. 1984. Epiphytic microbes as biological control agents. En *Plant Microbes Interactions*. Kosuge, T. y Nester, E.W. (eds.). McMillan Publishing, Co., New York, p. 381-399.
- CHALUTZ, E., DROBY, S. 1997. Biological Control of Postharvest Disease. En *Plant-Microbe Interaction and Biological Control*. Boland, G. J. y Kuykendall, L. (eds.). Marcel Dekker, INC. New York, 442 pp.
- CHALUTZ, E., DROBY, S., WILSON, C.L. y WISNIEWSKI, M.E. 1992. UV- Induced resistance to postharvest diseases of citrus fruit. *Phytochem. Phytobiol. B. Biol.*, 14:367.
- CHALUTZ, E. y WILSON, C.L. 1990. Biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.*, 74: 134-137.
- CHANDLER, P.T. 1993. Feeding brewers grain. *Agriculture and Environment Resources*, 345 pp.
- CHEN, E.C.H. 1981. Fatty acid profiles of some cultured and wild yeasts in brewery. *J. Americ. Soc. Brew. Chem.*, 39: 117-124.
- CHEN, S.L. y GUTMANIS, F. 1976. Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnol. Bioen.*, 18: 1455-1462.
- CHUNG, S.B. 1970. Strain improvement of *Phaffia rhodozima* by protoplast fusion. *FEMS Microbiol Lett.*, 93: 221-226.
- D'AMORE, T., CELOTTO, G., RUSSELL, I. y STEWARD, G.G. 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme Microb. Techn.*, 11: 411-416.
- DAVENPORT, R.R. 1976. Distribution of yeast and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. En *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson, C.H. y Preece, T.F. (eds.), Academic Press, New York. 325 pp.
- DAWSON, R.M.C., ELLIOT, D.C., ELLIOT, W.H. y JONES, K.M. 1986. Quantitative Inorganic Analysis. En *Biochemical Research*. Ed. Oxford Scientific Publishers, p 868-872.
- De MATOS, A.P. 1983. *Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by Geotrichum canadium and Penicillium digitatum*. PhD. Thesis. University of California. Riverside. 532 pp.
- DEAK, T. 1991. Foodborne Yeasts. En *Advances in Applied Microbiology*. Neidleman, S.L. y Lsakin, A.I. (eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California. 36: 179-278.
- DEGRE, R. 1994. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. En *Wine microbiology and biotechnology*. Fleet, G.H. (ed.). 2ª Ed. Harwood Academic Publishers. Switzerland. p. 421-447.
- DEINDOERFER, F.H. y WEST, J.M. 1960. Rheological properties of fermentation broths. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2: 265-273.
- DENNIS, C. 1983. *Post-harvest Pathology of Fruits and Vegetables*. Academic Press Inc., New York, 390 pp.
- DENNIS, C. y WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. of the British Mycolog. Soc.*, 57: 41-48.



- DHAMANKAR, V.S. 1992. Molasses, a source of nutrients for *in vitro* sugar cane culture. *Sugar cane.*, 4: 14-15.
- DICKINSON, C.H. y PREECE, T.F. 1976. *Microbiology of aerial plant surfaces*. Academic Press. New York, 512 pp.
- DOHMEN, R.J. y HOLLENBERG, C.P. 1996. *Schwanniomyces occidentalis*. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Wolf, K. (ed.). Espringer, Berlin, p. 117-138.
- DOMNEZ, S. y OZÇELIK, F. 1992. Ethanol fermentation of beet molasses by *Clostridium thermohydrosulfurium*. *Enzyme Microb. Technol.*, 14: 413-416.
- DROBY, S. y CHALUTZ, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. En *Biological control of postharvest diseases: Theory and practice*. Wilson, Ch.L. y Wisniewski, M.E. (eds.). CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA., p. 63-75.
- DROBY, S., CHALUTZ, E., HOREV, B., COHEN., L., GABA, V., WILSON, C. y WISNIEWSKI, M. 1993. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathol.*, 42: 418-422.
- DROBY, S., CHALUTZ, E. y WILSON, C. 1991. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News Information*, 2: 169-174.
- DROBY, S., CHALUTZ, E., WILSON, C. y WISNIEWSKI, M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaromyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. of Microbiol.*, 35: 794-800.
- DROBY, S., WILSON, C.L. Y WISNIEWSKI, M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaromyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbio.*, 35: 794-800.
- DROBY, D., CHALUTZ, E., WISNIEWSKI, M. y WILSON, C. 1992. Possible modes of action of yeast antagonists of postharvest diseases. *Proceeding of second IOBC/EFPP Workshop. Biological control of foliar and postharvest diseases*, . 142-147.
- DZIEZAK, J.D. 1987. Yest and yeasts derivatives. Definitions, characteristics and precessings. *Food Technology*, 41: 104-125.
- ECKERT, J.W y OGAWA, J.M. 1985. The chemical control of post-harvest diseases: Subtropical and tropical fruits. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23: 421-454.
- ELAD, Y. y KIRSHNER, B. 1992. Establishment of an active *Trichoderma* population in the phylloplane and its effect on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica*, 20: 137-141.
- EL-GHAOUTH, A. y WILSON, CH.L. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. *Postharvest News and Information*, 6: 5-11.
- EL-GHAOUTH, A., ARUL, J., GRENIER, J. y ASSELIN, A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of stawberry fruit. *Phytopatology*, 82: 398.
- ELLIS, D.H y PFEIFFER, T. 1991. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J. Epidemiol.*, 8: 321-325.
- ERGUN, M., MULTU, S.F. y GUREL, O. 1997. Improved ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* with EDTA, ferrocyanide and zeolite X addition to sugar beet molasses. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 68: 147-150.
- FALCONI, C. y MENDGEN, K. 1991. Inhibition of postharvest pathogens by epiphytic bacteria isolated from *Molus comunis* cultivar Golden Delicious. En *Communications from the Federal biological Institute for Agriculture and Forestry*. Berlina-Danken 266. Germany Plant Protection Convention. Berlin, 156 pp.
- FELIPE, M.G.A., VITOLO, M., MANCILHA, I.M. y SILVA, S.S. 1997. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrikysate for xylitol production: effect of pH. *Biomass and Bioenergy*, 13: 11-14
- FILONOW, A.B., VISHNIAC, H.S., ANDERSON, J.A. y JANISIEWICZ, W.J. 1996. Biological control of *Botrytis*

- cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control*, 7: 212.
- FINN, R.K. 1967. Agitation and aeration. *Biochem. Biol. Eng. Sci.*, 1: 69-99.
- FOKKEMA, N.J. 1976. Antagonisms between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. En *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Dickinson, C.H. y Preece, T.E. (eds.) Academic Press, New York, p. 487-506.
- FOKKEMA, N.J. y LOBEER, J.W. 1974. Interactions between *Alternaria porri* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. *Phytopathology*, 64: 1128-1133.
- FOKKEMA, N.J., KOHL, J y ELAD, Y. 1993. Biological control of foliar and postharvest diseases, *Bull. Int. Org. Biol. Integr. Control. OILB/SROP.*, 16: 246.
- FOKKEMA, N.J., DEN HOUTER, J.G., KOSTERMAN, Y.J.C. y NELIS, A.L. 1979. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 72: 19-29.
- FRANZ, B. 1961. Kinetics of the alcoholic fermentation during the propagation of baker's yeast. *Die Nahrung* 5: 458-481.
- FRIEDEMANN, T.E., WITT, N.F. y NEIGHBORS, B.W. 1967. Determination of starch and soluble carbohydrates. I. Development of method for grains, stock feeds, cereal foods, fruits and vegetables. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 50:945.
- GARVER, J.C., NAVARINE, I. y SWANSON, A.M. 1966. Factors influencing the activation of baker's yeast. *Cereal Sci. Today*, 11: 410-418.
- GASSEM, M.A., SCHMIDT, K.A. y FRANK, J.F. 1997. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. *J. Food Sci.*, 62: 171-173.
- GAUDREAU, H., CHAMPAGNE, C.P., GOULET, J. y CONWAY, J. 1997. Lactic fermentation of media containing high concentrations of yeast extracts. *J. Food Sci.*, 62: 1072-1075.
- GOLUBEV, W.I. 1989. Catabolism of m-inositol and taxonomic value of D-glucuronate assimilation in yeasts. *Mikrobiologiya.*, 58: 276-283.
- GOODMAN, R.N. 1967. Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* infection by a virulent strains and three other bacterial species. *Phytopathology*, 57: 22-24.
- GRIFFITHS, E. 1981. Iatrogenic plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 19: 69-82.
- GULLINO, M.L. y KULPERS, L.A.M. 1994. Social and political implication of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Ann. Rev. Phytopatol.*, 32: 559-562.
- GUTTER, Y. y LITTAUER, F. 1953. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* against citrus fruit pathogens. *Bull. Res. Counc. Israel*, 33:192.
- HAJLAONI, M.R., BENHAMOU, N. y BELANGER, R.R. 1992. Mode of action of the biocontrol agent, *Stephanosascus flocculosus*. Proceeding of second IOBC/EFPP Workshop. Biological control of foliar and postharvest diseases, 341 pp.
- HALLSWORTH, J.E y MAGAN, N. 1994\*. Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohol and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, 140: 2705-2713.
- HALLSWORTH, J.E y MAGAN, N. 1995. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology-UK*, 141: 1109-1115.
- HALLSWORTH, J.E y MAGAN, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microb.*, 62: 2435-2442.

- HARDER, W. y DIJKHUIZEN, L. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 1-23.
- HARRISON, S. 1967. Aspects of commercial yeast production. *Proc. Biochem.* 2: 41-45.
- HASTINGS, J.J. y JACKSON, T. 1967. Chemical engineering practice. Vol 8. Cremer H.W. y Watkins, S.B. (eds.) Butterworks, London. 406 pp.
- HATA, Y., KITAMOTO, K., GOMI, K., KUMAGAI, C., TAMURA, G. y HARA, S. 1991. The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*, its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol Chem.*, 55: 941-949.
- HAUTERA, P. y LOVGÉN, T. 1975. The fermentation activity of baker's yeast. Its variation during storage. *Baker's Digest.*, 49: 36-37.
- HEWITT, L.F. 1950. Oxidation reduction potentials in bacteriologic and biochemistry. *Livingstone-Edimbourg.*, 5: 215-220.
- HITCHCOCK, C y TAYLOR, E. 1939. Quantitative Inorganic Analysis En *Biochemical Research*. Dawson, R., et al., (Eds.) Ed. Oxford Scientific Publishers, p 868-872.
- HOCKING, A. D. 1986. Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 269-273.
- HOCKING, A. D. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. En *Stress tolerance of fungi*. Jennings, D.H. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York., p 233-256.
- HOFSTEIN, R.S., FRIEDLENDER, T., CHALUTZ, E. y DROBY, S. 1994. Large-scale production and pilot testing of biological control agents for postharvest diseases. En *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Theory and practice*. Wilson, C.L. y Wisniewski, M.E. (eds.). CRC Press, Boca Ratón, FL, USA p. 89-100.
- HOUGH, J.S. 1990. *Biología de la cerveza y de la malta*. Ed. Acribia, Zaragoza, 194 pp.
- HOUGH, J.S., BRIGGS, D.E., STEVENS, R. y YOUNG, T.W. 1991. Malting and brewing science. Vol 2. 2ª Ed. Chapman & Hall, London, 914 pp.
- HUDSON, J.R. y GUYMON, J.F. 1960. The formulation of higher diaphetic alcohols by mutant strains of *S. cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88: 157-166.
- HULME, M.A. y SHIELDS, J.K. 1970. Biological control of decay fungi in wood by competition for non-structural carbohydrates. *Nature*, 227: 300-302.
- HURLEY, R. DE LOUVOINS, J. y MULHALL, A. 1987. Yeasts as human and animal pathogens. En *The yeasts*. Vol 1. Rose, A.H., Harrison, JS (eds.), 2ª Ed. Academic Press. New York, 207-281.
- IMRIE, F.K. E. 1969. Sugar and molasses. *Process Biochemistry*, Jan., 34-35.
- INGLEDEW, W.N. y KUNKEE, R.E. 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36: 65-76.
- INLOW, D., McRAE, J. y BEN-BASSAT, A. 1988. Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engineered yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, 32: 227-234.
- JAKUNOUWSKA, J. y WŁODARCZYK, M. 1969. Observations on yeast growth and metabolism influenced by beta-indolylacetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 35 (Suppl. Yeast Symp.).
- JANISIEWICZ, W.J. 1988a. Biological control of diseases of fruit. En *Biocontrol of Plant Diseases. Vol II*. Mukerji, K.G. y Garg, K.L. (eds.). CRC Press, Boca Ratón, FL, USA. 153-165.
- JANISIEWICZ, W.J. 1988b. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonistic mixtures. *Phytopathology*,

78: 194-198.

- JANISIEWICZ, W.J. 1991. Biological control of postharvest fruit diseases. En *Handbook of Applied Mycology. Soil and Plants*. Vol 1. Arova, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G. y Knudsen, G.R. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, p. 301-325.
- JANISIEWICZ, W.J. y BORS, B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61: 3261-3267.
- JANISIEWICZ, W.J., USALL, J. y BORS, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold of apples. *Phytopathology*, 82: 1364-1370.
- JANISIEWICZ, W.J. y ROITMAN, J. 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 78: 1697-1700.
- JANISIEWICZ, W.J. 1987. Postharvest biological control of blue-mold on apples. *Pythopathology*, 77: 481-485.
- JENNINGS, D.H. 1996. *The Physiology of Fungal Nutrition*. Cambridge University Press Ed. Cambridge. p 37-250.
- JJAKLI, M.H. y LEPOIVRE, P. 1992. Biological control of postharvest *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on apples. Proceeding of second IOBC/EFPP Workshop. *Biological control of foliar and postharvest diseases*, 145 pp.
- JJAKLI, M.H., LEPOIVRE, P., TOSSUT, P. THORNARD, P. 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 58: 1349-1358.
- JUSTUM, A.R. 1988. Comercial application of biological control: status and prospects, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B: 318-357.
- JUVEN, J.B. 1976. Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3,5. *Food Technol.* 39: 819.
- KAUTZMANN, R. 1969. Effect of amino acids on yield and quality of baker's yeast. *Branntweinwirtschaft*, 109: 214-222.
- KOCH, E. 1996. Mode of action and potential use of microbial antagonists of plant diseases. *Gesunde Pflanzen*, 48: 121-198.
- KORSTEN, L., DE VILLIER, E.E., WEHNER, F.C. y KOTZE, J.M. 1994. A review of biological control of postharvest diseases of subtropical fruits. En *Postharvest Handling of Tropical Fruits*. Champ, B.R., Highley, E. y Johnson, G.L. (eds.). ACIAR Proc. 50. p. 172-185.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. General classification of the yeasts. En *The yeasts, A taxonomic study*. Kreger-van Rij, N.J.W (ed.) Elsevier Science Publication, Amsterdam. 114 pp.
- KREUS, R. 1993. Nuevos desarrollos en la aplicación de levaduras en enología y panadería (New development in the application of yeasts in winemaking and breadmaking). *Aliment. Equipos Tecnol*, 98: 102.
- KUC, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience*. 32: 854-860.
- KURTZMAN, C.P. 1990 Classification and general properties of yeasts. En *Yeasts. Biotechnology and biocatalysis*. Verarchtert, H. y De Mot, R. (eds). Ed. Dekker. New York, 522 pp.
- KURTZMAN, C.P., PHAFF, H.J. y MEYER, S.A. 1983. Nucleic acid relatedness among yeasts. En *Yeast Genetic. Fundamental and applied aspects*. Smith, A.R.W., Spencer, J.F.T, Spencer, D.M. (eds.). New York, p 139-166.
- LAFON-LAFOURCADE, S. 1983. Wine and brandy. En *Biotechnology*, Vol 5., Rehm, H. J. and Reed, G. (eds.). VCH Publishing Company, New York, 243 pp.
- LARGE, P.J. 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. *Yeas*, 2: 1-34.

- LAST, F.T. y PRICE, D. 1969. Yeasts associated with living plants and their environs. En *The yeasts*. Rose, A.H. y Harrison, J.S. (eds.). Academic Press London, p. 183-218.
- LEBEN, C. 1985. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 3: 209-230.
- LEE, CH.Y. y MATTICK, L.R. 1989. Composition and nutritive value of apple products. En *Processed apple products*. Downing, D.L. (ed.). Van Nostrand Reinhold, New York, p. 303-341.
- LEE, J., YUP LEE, S. y PARK, S. 1997. Fed-batch culture of *Escherichia coli* W. by exponential feeding of sucrose as a carbon source. *Biotechnology Techniques*, 11: 59-62.
- LEIBINGER, W., BREUKER, B., HAHN, M. y MENDHE, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87: 134-139.
- LILJESTROM-SUOMINEN, P.L., JOUTSJOKI, V. y KORHOLA, M. 1988. Construction of stable  $\alpha$ -galactosidase-producing baker's yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 245-249.
- LINEK, V. y BENES. 1978. Enhancement of oxygen absorption into sodium sulfite solutions. *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 697-707.
- LINGANE, R. 1947. Cuantitativa Inorganic Analysis En *Biochemical Research*. Dawson, R., et al., (Eds.) Ed. Oxford Scientific Publishers, p 868-872.
- LODEER, J. 1970. *The yeasts A taxonomic study*. 2<sup>a</sup> ed. North Holland Publishing. Co., Amsterdam, 276 pp
- LONSANE, B.K., VIJAYALAKSHMI, G. y KRISHNAIAH, M.M. 1997. Yeasts and energy. The production for fuel-grade ethanol. En *Yeasts in natural and artificial habitats*. Spencer, J.F.T. y Spencer, D.M. (eds.). Ed. Springer, Berlin, 315-352.
- LOPEZ, L., WITTIG, E., SLIGHT, A. y HORTS, A. 1996. Elaboración de bebidas fermentadas para senescentes sobre la base de suero de quesería. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 5: 20-29.
- LOYD, A.T. y SHARP, P.M. 1993. Synonymous codon usage in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 9: Acid Res., 18: 6438.
- MADRID, A. 1981. *Modernas técnicas de aprovechamiento del lactosuero*. Ed. A. Madrid. Madrid. 153 pp.
- MANGIOT, C., SABLAYROLLES, J.M., ROUSTAN, J.L. y BARRE, P. 1997. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme Microb. Tech.*, 20: 373-380.
- MARSHALL, V.M. y TAMINE, A.Y. 1997 Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 35-41.
- MARSHALL, C.R. y WALKLEY, V.T. 1951. Some aspects of microbiology applied to commercial apple juice production I. Distribution of micro-organisms on the fruit. *Food Res*, 16: 448-456.
- MATELES, R.I. 1971. Calculation of oxygen required for cell production. *Biotechnol. Bioeng.*, 13: 581-582.
- MATZ, S.A. 1988a. Modern baking technology. *Sci. Am.*, 25: 123:134.
- MATZ, S.A. 1988b. Packaging, nutrition, product development, quality assurance En *Bakery technology*; Elsevier Science Publ. McAllen. Tx., p. 169-204.
- MAUERSBERGER, S., OHKUMA, M., SCHUNCK, W.H. y TAKAGI M. 1996. *Candida maltosa*. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Wolf, K. (ed.). Ed. Espringer, Berlin, 411-580.
- McCANN, A.K. y BARNETT, J.A. 1986. The utilization of starch by yeast. *Yeast*, 2: 109-115.
- McLAUGHLIN, R.J., WISNISIEWSKI, M.E., WILSON, C., y CHALUTZ, E. 1990. Effects of inoculum concentration

- and salts solutions on biological control of postharvest diseases of apples with *Candida* sp. *Phytopathology*, 80: 456-461.
- McQUILKEN, M.P., BUDGE, S.P. y WHIPPS, J.M. 1997. Production, Survival and evaluation of liquid culture-produced inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotinium*. *Biocontrol Sci. Techn.*, 7: 23-36.
- McWILLIAM, I.C. y CHAPPERTON, J.F. 1986. Dynamic aspects of nitrogen metabolism in yeast. *Eur. Brew. Conv. Proc.*, 271-279.
- MEILGAARD, M. 1977. Composición del mosto. En *El cervecero en la práctica*. Broderick., H.M. et al. (eds.). Impressions, Inc., Madison, p. 128-149.
- MEYENBURG, H.K. von. 1969: Energetics of the budding cell of *S. cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. *Archives Microbiol.*, 66: 289-303.
- MEYER, S.A., AHERN, D.G. y YARROW, D. 1984. *The yeasts, a taxonomic study*. Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.). Elsevier, Amsterdam, p. 585-844.
- MIRO, M.A. 1997. *Aumento de la eficacia de dos agentes de biocontrol de Penicillium expansum en fruta de pepita en Postcosecha*, p 36-37.
- MOLINE, H.E. 1991. Biocontrol of postharvest bacterial disease of fruits and vegetables. En *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables*. Agricultural Res. Serv. U.S. Dept. Agriculture A.R.S., 9. 114 pp.
- MORAIS, P.B., ROSA, C.A., LINARDI, V.R., PATARO, C. y MAIA, A.B.R.A. 1997. Short communication: characterization and succession of yeast population associated with spontaneous fermentations during the production of brazilian sugar-cane aguardente. *World J. of Microb. & Biot.*, 13: 241-243.
- MORIMURA, S., YA LING, Z. y KIDA, K. 1997. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 271-274.
- MOSSEL, D.A. e INGRAND, M. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 18: 95-232.
- MOSSEL, D.A. y MORENO, G. 1982. Alteraciones de los alimentos por microorganismos. En *Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y calidad de los alimentos*. 3ª Ed. Ed. Acribia. Zaragoza
- MOULING, G. y GALZY, P. 1984. Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnol. Gen Eng. Rev.*, 1: 347-373.
- NAGODAWITHANA, T.W. 1986. Yeasts: Their role in modified cereal fermentation. En *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 8., Pomeranz, Y. (Ed.) American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota., p. 15-104.
- NEAL, J.L., LARSON, R.I. y ATKINSON, T.G. 1973. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant Soil.*, 39: 209-212.
- NEWHOOK, F.J. 1951. Microbiological control of *Botrytis cinerea*. Pers. I. The role of pH changes and bacterial antagonism. *Ann. of App. Biol.*, 38: 169-184.
- NICKERSON, W.J. y CARROLL, W.R. 1945. On the metabolism of *Zygosaccharomyces*. *Arch. Biochem.*, 7: 257-263.
- NIGAM, N. y MUKERJI, K.G. 1988. Biological Control. Concepts and practices. En *Biocontrol of Plant Diseases*. Mukerji, K.J. y Grag, K.L. (Eds.). C.R.C Press, Boca Ratón, Florida, p. 2-29.
- NOTKINA, L.G., BALYBERDUNA, L.M. y LAVRECHUK, L.D. 1975. The effect of nitrites in baker's yeast manufacture. *Khlebopek. Konditer. Promst.* 2: 28-31.

- OUGH, C.S. 1966. Fermentation rates of grape juice. II. Effect of initial °Brix, pH and fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.*, 17: 20-26.
- OURA, E., SUOMALAINEN, H. y PARKKINEN, E. 1974. Changes in commercial baker's yeast during its ripening period. *Fourth Intl. Symp. Proc. on Yeast*, B25: 125-126.
- OURA, E., SUOMALAINEN, H. y VISKARI, R. 1982. Bread-making. En *Economic Microbiology*. Vol. 7. Rose, A.H. (ed.). Academic Press, New York. 542 pp.
- PANOPOULOS, N.J. 1986. Tactics and sensibility of genetics engineering of biocontrol agents. En *Microbiology of the phyllosphere*. Fokkema, N.J. y Van del Heuvel (eds.). Cambridge University Press, p. 312-332.
- PARISH, M.E. y HIGGINS, D.P. 1989. Yeasts and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. *J. Food Protect.* 4: 261-263.
- PARK, W.S., MURPHY, P.A. y GLATZ, B.A. 1990. Lipid metabolism and environmental isolates of oleaginous yeast *Apiotricum curvatum* grown at different carbon to nitrogen ratios. *Can J. Microbio.*, 36: 318-326.
- PARRY, D.W. 1990. *Plant pathology in agriculture*. Cambridge University Press. Cambridge, 388 pp.
- PASCUAL, S., MAGAN, N. y MELGAREJO, P. 1996. Improved biocontrol of peach twig blight by physiological manipulation of *Epicoccum nigrum*. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases*, 4D: 411-412.
- PATON, A.M. 1960. The role of *Pseudomonas* in plant disease. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 526-532.
- PENNA, A.L.B., BARUFFALDI, R. y OLIVEIRA, M.N. 1997. Optimization of yogurt production using demineralized whey. *J. Food Sci.*, 62: 846-850.
- PENNYCOOK, S.R. y NEWHOOK, F.J. 1981. Seasonal changes in the apple phylloplane microflora. *New Zealand J. of Bot.*, 19: 273-283.
- PEPPLER, H.J. 1983. Fermented feeds and feed supplements. En *Biothecnology*. Vol. 5. Reed, G. (ed.). WCH Publishy Co., Weinheim., West Germany, 243 pp.
- PEYNAUD, E. y DOMERCQ, S. 1964. The yeasts of the Gironde (French). *Ann. Inst. Natl. Rech. Agron.*, 4: 265-300.
- PHAFF, H.J. y KURTZMAN, C.P. 1984. Discussion of the general belonging to de ascosporogenous yeasts-*Genous hypomyces*. En *Yeasts taxonomy study*. Kreger-Van Rij, N.W.J. (ed.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 252-262.
- PITT, J.I. 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of food of plant origin. En *Water Relations of Foods*. Duckworth, R.B (ed.). Academic Press. London., 273 pp.
- PREECE, T.F. y DICKINSON, C.H. 1971. *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Academic Press. London, 123 pp.
- PUSEY, L. 1994. Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. En *Biological control of Postharvest diseases. Theory and practice*. Wilson C.L. y Winiewski, M.E. (eds.). CRC Press, Boca Ratón, FL, USA., p. 77-89.
- PUSEY, P.L. y ROBINS, W. 1991. Preharvest peaches, postharvest apples and postharvest grapes are coated with *Bacillus subtilis* B-3, to inhibit growth of brown rot, gray mold rot and bitter rot. Patent number 5.047.239. Secretary of Agriculture USA.
- PUSEY, L. y WILSON, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.*, 68:753-768.

- PUSEY, P.L., WILSON, C.L., HOTCHKISS, M.W. y FRANKLIN, J.D. 1986. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran and cold-storage conditions. *Plant Dis.* 70: 587-590.
- RAGSDALE, N.N. Y SISLER, H. D. 1994. Social and political implication of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United-States. *Ann. Rev. Phytopatol.* 32: 545.
- REED, G. 1981. Use of microbial cultures: yeast products. *Food Technology.* 35: 89-94.
- REED, G. 1983. Production of bakers' yeast. En *Industrial microbiology*. Reed, G. (ed.) Avi Publishing Company. Connecticut.USA. 593-663.
- REED, G. y NAGODAWITHANA, T.W. 1991. Yeasts thechnology. 2ª ed. Ed. AVI. 454.
- RENDALL-DUNN, A.J. 1991. General News. *Postharvest News and Information* 2-3
- RHODES, D.J. 1993. Formulation of biological control agents. En *Exploitation of Microorganisms*. Jones, D.G.(ed.). Chapman & Hall. London. p. 413-437.
- RIBEREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., RIBEREAU-GAYON, P., SUDRAUD, P. y USSEGLIO-TOMASSET, L. 1988. Caratteri dei vini. Maturazione dell'uva. Lieviti e batteri. En *Trattato di scienza e tecnica enologica*. De. AEB. p. 195-196.
- RICHARDS, J.W. 1968. *Process biochemistry*. 3: 28.
- ROBERTS, R.G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology.* 80: 526-530.
- ROBERTS, R.G. 1991. Characterization of postharvest biological control of deciduous fruit diseases by *Cryptococcus* spp. En *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables Workshop*. Wilson, C.L. y Chalutz, E. (eds.) U.S. Dep. Agric. Res. Serv. ARS, 92. 37-48.
- ROBERTS, R.G. 1994. Integrating biological control into postharvest disease management strategies. *HortScience*, 29: 758-762.
- ROBERTSON, J.J. y HALVORSON. O.H. 1957. The components of maltozymase in yeast, and their behavior during deadaptation. *J. Bacteriol.* 73:186-198.
- RUSELL, I., JONES, R. y STEWART, G.G. 1987. The primary industrial microorganism. En *Biological research on industrial yeast*. Stewart, G.G. Rusell, I., Kein, R.D., y Hiebsch, R.R: (eds.). Vol 1. CRC. Press. Boca Ratón, F.L.,USA p. 1-20.
- SALIOLA, M., BELLARDI, S., MARTA, I. y FALCONE, C. 1994. Glucose metabolism and ethanol production in adh multiple and null mutants of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* 10: 1133-1140.
- SANDERSON, G.W. y REED, G. 1985. *Fermented products from whey and whey permeate*. IDF Seminar (New Dairy Products via New Technology), Atlanta, Ga.
- SCOTT, R. 1991. *Fabricación del queso*. Ed. Acribia. Zaragoza. p. 313-321.
- SCHAAF, I. 1988. Thee effect of overproduction of glycolytic enzyme on the rate of alcoholic fermentation. *Yeast New Letter.* 37: 8
- SCHAFFLER, K., DAY-LEWIS, C.M.J., CLARKE, M. y JEKOT, J. 1997. Determination of sugars in beet and cane final molasses by ion chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International.* 80: 603-610.
- SCHEDA, R. 1966. Merkmalsveränderugen bei Hefen der Gattung *Saccharomyces*. *Monatsschr Brau* 19: 256-258.
- SCHEDA, R. y YARROW, D. 1966. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. *Arch Mikrobiol.*, 55: 209-225



- SCHONBECK, F. y DEHNE, H.W. 1988. Use of microbial metabolites inducing resistance against plant pathogens. En *Microbiology of the Phyllosphere*. Fokkema, N.J. y Van del Heuvel, J. (eds.). Cambridge University Press, UK. 365-375.
- SCHROTH, M.N., LOPER, J.E. y HILDERBRAND, D.C. 1984. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. En *Current Perspectives in Microbial Ecology*, Klug, M.J. y Reedy, C.A. (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, 710 pp.
- SHARPLES, R.O. 1982. Effects of ultra-low oxygen conditions on the storage quality of Englix Cox's Orange Pippin apples. En *Proceedings of the third National controlled Atmosphere Research Conference on controlled atmospheres for storage and transport of perishable agricultural commodities* Richerdson, D.C. y Meheriuk, M.M. (eds.). p.131-138.
- SHOLBERG, P.L. y SHIMIZU, B.N. 1991. Use of natural plant products, hinokitiol, to extend the shelf-life of peaches. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 24: 273.
- SING, V. 1980. Control of Alternaria rot in citrus fruit. *Australian Plan Pathology*, 9: 12-13.
- SINGH, V. y KAINSA, R.L. 1983. Microbial flora of grapes in relation to storage and spoilage. *Indian Phytopathol.*, 36: 72.
- SMELT, J.P., RAATJES, G., CROWTHER, J.S y VERRIPS, C. 1982. Growth and toxin formulation by *Clostridium butulinum* at low pH values. *J. Appl. Bacteriol.*, 52: 75-77.
- SMILANICK, J.L. 1994. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. En *Biological control of postharvest diseases: Theory and practice*. Wilson, Ch.L. y Wisniewski, M.E. (eds.). CRC Press, Boca Ratón, FL, USA. 25-42.
- SMILANICK, J.L. y DENIS-ARRUE, R. 1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant. Dis.* 76: 481-482.
- SMITH, J.S., HILIER, A.J. y LEES, G.J. 1975 The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.*, 42: 123-138.
- SOLINGEN, P. van, y VAN DER PLAAT, J.B. 1977. Fusion of yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.* 130: 946-947.
- SOLS, A. 1956. Selective fermentation and phosphorylation of sugar by Sauternes yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 20: 62-68.
- SORENSE, E. 1912. Cuantitative Inorganic Analysis En *Biochemical Research*. Dawson, R., et al., (Eds.)Ed. Oxford Scientific Publishers, p 868-872.
- SOTTIEZ, P. 1989. Subproductos derivados de la elaboración de los quesos. En *Los productos lácteos. Transformación y tecnologías*. Luquet, F.M. (ed.) Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, p 288-320.
- SPALDING, D.H. 1970. Post harvest use of benomyl and thiabendazole to control blue mold rot development in pears. *Plant Dis. Rep.* 54: 655.
- SPENCER, J.F.T. y SALLANS, H.R. 1956. Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts. *Can. J. Bot.* 2: 72
- SPENCER, J.F.T. y SPENCER, D.M. 1983. Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 121-142.
- SPENCER, J.F.T. y SPENCER, D.M. 1997. *Yeasts in natural and artificial habitats*. Ed. Springer, Berlin, 381 pp.
- SPOTTS, R.A. y CERVANTES, L.A. 1986. Populations pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis.* 70: 106-108.
- SPOTTS, R.A. y DOBSON, R.L. 1989. Effects of the experimental fungicide R. H. 886 in *Mucor piriformis*. *Pestic. S.*

- Sci.*, 25: 391-399.
- SPREER, E. 1991. *Lactologia industrial*. 6ª ed. Ed. Acribia, Zaragoza, p. 527-548.
- SREEKRISHNA, K. y DICKSON, R.C. 1985. Construction of strains of *S. cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7909-7913.
- SREEKRISHNA, K. y KROPP, K.E. 1996. *Pichia pastoris*. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Wolf, K. (ed.). Ed. Espringer, Berlin, p. 203-254
- STAMFORD, T.L.M., FERNANDES, Z.F. y STAMFORD, N.P. 1991. Microbial protein enrichment of sugar-cane bagasse for animal feeds. *Arq. Biol. Technol.* 34: 503-507.
- STANBURY, P.F., WHITAKER, A. y HALL, S.J. 1995. Principles of fermentation technology. 2ª Ed. Pergamon, Oxford, 357 pp.
- STEVENS, C., KHAN, V.A., THANG, A.Y. y LU, J.Y. 1990. The effect of ultraviolet irradiation on mold rots and nutrients of stored sweet potatoes. *J. Food Prot.*, 53: 223.
- STRECHT, A.W. 1989. Biological control of blueberry and cranberry fruit rots (*Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Acta Hort.* 241: 301.
- SZCZODRAK, J., SZEWCZUK, D., ROGALSKI, J. y FIEDUREK, J. 1977. Selection of yeast strain and fermentation conditions for high-yield ethanol production from lactose and concentrated whey. *Acta Biotechnol.* 17: 51-61.
- TEIXIDÓ, N. 1997. *Impacte ecològic i efectivitat de l'aplicació de l'antagonista Candida sake CPA-1 al camp per al control biològic de la podridura blava en postcollita de mançanes "Golden Delicious"*. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. 196 pp.
- TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., USALL, J. y MAGAN, N. 1998. Control of blue mold apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phitopatology*, 88: 960-964.
- TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., USALL, J., SANCHIS, V. y MAGAN, N. 1998. Ecophysiological responses of the biocontrol yeast *Candida sake* to water, temperature and pH stress. *Journal of Applied Microbiology* 84:192-200.
- THORNE, R.S. 1949. Mechanism of nitrogen assimilation from amino acids by yeast. *Nature* 164: 369-370.
- TILBURY, R.H. 1980. The microbial stability of intermediate moisture foods with respect to yeasts. En *Intermediate Moisture Foods*, Davies, R., Birch, G.G y Parker, J.K. (eds.). Applied Science Publishers, London, p. 138.
- TREVAN, M.D., BOFFEY, S., GOULDING, K.H. y STANBURY, P. 1990. *Biocología: principios biológicos*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- TRIVERDI, N.B., JACOBSON, G.K. y TESCH, W. 1986. Baker's yeast. En *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, vol 24, issue 1, Stewart, G.G. y Russell, I. (eds.) CRC Press, Boca Raton, Fla., p. 75-109.
- TRONSMO, A. 1983. *Trichoderma harziianum* used as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple. *Les Colloques de l'INRA*. 18: 109-113.
- TRONSMO, A. 1986. Use of *Trichoderma* spp. in biological control of necrotrophic pathogens. En *Microbiology of the Phyllosphere*. Fokkema, N.J. y Van del Heuvel, J. (eds.). Cambridge University Press, 348-362.
- TRONSMO, A. y RAA, J. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii*, against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift*. 89: 216-220.
- TWEIT, M. 1967. *Biology and the manufacturing*. p 3. Brook, M. (ed.) Academic Press. London, 256 pp
- UPSTONE, M. 1977. Evaluation of chemicals for control of *Phytophthora* fruit rot in stored apples. *Proc. Br. Crop. Prot. Conf. Pest and Diseases*. 1: 565.

- USALL, J. 1995. *Control biològic de Penicillium expansum en postcollita de fruita de llavor*. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. 194 pp.
- UTKHEDE, R.S. Y SHOLBERG, P.L. 1986. In Vitro inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and in vivo control of two postharvest cherry diseases, *Can. J. Microbiol.* 32: 963.
- VAN ECK, J.H., PRIOR, B.A. I BRANDT, E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 1047-1054.
- VAN ECK, K.H., PRIOR, B.A. y BRANDT, E.V. 1989 Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress, *J. Gen. Microbio.* 135: 3505.
- VARNAM, A.H. y SUTHERLAND, J.P. 1994. *Beverages technology, chemistry and microbiology*. Chapman & Hall, London. p. 27-71.
- VENO, M. y YOKOYA, F. 1994. Formulation of culture medium for growth of microbes from the sugar cane industry and use of cetyltrimethylammonium bromide as antimicrobial agent. *Rev. Microbiol.*, 25: 261-269.
- VERDUYN, C., POTSMAN, E., SCEFFERS, W.A. y VAN DIJKEN, J.P. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* 8: 501-517.
- VIÑAS, I., USALL, J., TEIXIDO, N., FONS, E., y OCHOA DE ERIBE, J. 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases of apples and pears with a new strain of *Candida sake*. *Pro. British Crop Protection Conference. Pests and Diseases.* 6: 603-608.
- VIÑAS, I., USALL, J., TEIXIDO, N., y SANCHIS, V. 1997. Nueva cepa de levadura *Candida sake* (Saito and Ota) Van Uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fúngicas de postcosecha en frutas. Patente española 2089981. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- VIÑAS, I., USALL, J., TEIXIDO, N., y SANCHIS, V. 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, 40: 6-16.
- VITOLO, M., DURANTI, M.A. y PELLEGRIM, M.B. 1995. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grow in sugarcane blackstrap molasses. *Journal of Industrial Microbiology.* 15: 75-79.
- WALKER, G.M., BIRCH, R.M., CHANDRASENA, G. y MAYNARD, I. 1996. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in industrial yeasts. *Am. Soc. Brew. Chem.*, 54: 13-18.
- WALPOLE, N. 1914. *Cuantitativa Inorganic Analysis En Biochemical Research*. Dawson, R., et al., (Eds.)Ed. Oxford Scientific Publishers, p 868-872.
- WANG, H.Y., COONEY, C.L. y WANG, D.I. 1979. Computer control of baker's yeast production. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 69-86.
- WARD, O. P. 1989. *Biotecnología de las fermentaciones. Principios, procesos y productos*. Editorial Acribia. Zaragoza. 274 pp.
- WEBSTER, J. y LOMAS, N. 1964. Does *Trichoderma viridae* produce gliotocin and viridin?. *Transactions of the Mycol. Society.* 47: 535-540.
- WESOLOWSKI-LOUVEL, M., BREUNIG, K.D. y FUKUHARA, H. 1996. *Kluyveromyces lactis*. En *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Wolf, K. (ed.). Ed. Espringer, Berlin, p. 139-202.
- WHITAKER, A. 1973. Fermentation economics. *Process Biochemistry.* 8: 23-26.
- WHITE, J. 1954. *Yeast Technology*. Chapman and Hall. London. 454 pp.
- WICKLOW, D.T. 1981. Interference competition and the organization of fungal communities. En *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Wicklow, D.T. y Carroll, G.C. (eds.), Marcel Dekker,

- New York, 351 pp.
- WILLIAMS, A.J., WALLACE, R.H. y CLARK, D.S. 1956. Changes in the yeast population on Quebec apples during ripening. *Can. J. Microbiol.*, 2: 645-648.
- WILSON, C.L. y CHALUTZ, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rot of citrus with antagonistic yeast and bacteria. *Scientia Horticulturae*. 40: 105-112.
- WILSON, C.L. y WISNIEWSKI, M.E. 1989. Biological control of Postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 425-241.
- WILSON, C.L. y WISNIEWSKI, M.E. 1994. *Biological control of postharvest diseases*. Theory and Practise. CRC. Press. Inc. Boca Raton. Florida. USA.
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., BILES, C.L., McLAUGHLIN, R., CHALUTZ, E. y DROBY, S. 1991. Biological control of post-harvest diseased of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.* 10: 172-177.
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., DROBY, S. y CHALUTZ, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*. 53: 183-189.
- WILSON, CH.L., EL GHAOUTH, A., CHALUTZ, E., DROBY, S., STEVENS, C., LU, J., KHAN, V. y ARUL. J. 1994. Potential of induced resistance to control psthavestr diseases of fruits and vegetables, *Plant Dist.*, 78: 837.
- WINGE, O. y ROBERTS, C. 1949. Inheritance of encymatic characters in yeasts, and the phenomom on long youngterm adaptation. *C.R. Trav Carlsberg Sér Physiol.* 24: 263-315
- WISNIEWSKI, M.E. y WILSON, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *Hortscience*. 27: 94-98.
- WISNIEWSKI, M.E., BILES, C.L., DROBY, S., McLAUGHLIN, R.J., WILSON, C.L. y CHALUTZ, E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant P.*, 39:245-258.
- WISNIEWSKI, M.E., WILSON, C.L., CHALUTZ, E. y HERSHBERGER, W. 1988. Biological control of postharvest diseases of fruit: inhibition of *Botrytis* rot on apples by an antagonistic yeast. *Proc. Elec. Microsc. Soc. Am.* 46: 290.
- WOEHRER, W. y ROEHR, M. 1981. Regulatory aspects of baker's yeast in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 567-581.
- WOODHEAD, S.H., O'LEARY, A.L., O'LEARY, D.J. y RABATIN, S.C. 1990. Discovery, development and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective. *Can. J. of Plant Pathol.*, 12: 328-331.
- WRATHER, J.A., KUC, J. y WILLIAMS, E.B. 1973. Protection of apple and pear fruit tissue against fireblight with non-pathogenic bacteria. *Phytopathology*. 63: 1075-1076.
- YAMADA, Y., y KONDO, K. 1972. Taxonomic significance of the coenzyme Q sistem in yeasts and yeast-like fungi. En *Yeasts and Yeast-like Microorganisms in Medical Science*,. Iwaata, K. (ed.). Proc. 2nd Int. Speciaezed Symp. Yeast. Tokyo, p. 63-69.
- YARROW, D., Y MEYER, S.A. 1978. Proposal for amendment of the diagnosis of the genus *Candida* Berkhout nom. cons. *Int. J. Systematic Bacteriol* 28: 611-615.
- ZÄHNER, H. 1979. What are secondary metabolites? En *Folia Microbiology*. 24: 435-443.



# ***Resumen***

---

## RESUMEN

Las diversas patologías de la postcosecha de frutas han sido controladas durante muchos años por fungicidas químicos de síntesis. Debido a que los tratamientos químicos son potencialmente tóxicos, se están haciendo grandes esfuerzos por restringir o eliminar su utilización. Entre las nuevas estrategias que se están desarrollando se considera al control biológico como uno de los medios más efectivos en el control de las enfermedades fúngicas en la postcosecha de frutas.

El tratamiento con los microorganismos antagonistas se puede realizar a la entrada de la fruta en las cámaras frigoríficas, utilizando las mismas tecnologías y equipos que se emplean con los productos fitosanitarios.

La cepa de *Candida sake* (CPA-1), fue aislada de la superficie de manzanas procedentes de frigoconservación, por investigadores de la Unitat de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA. Esta cepa presenta una efectividad muy elevada como antagonista en el control de los principales mohos causantes de podredumbres en postcosecha de fruta. La citada cepa está patentada en el Estado Español y se encuentra pendiente de aprobación en otros 21 países.

La optimización de la producción del agente de biocontrol *C. sake* (CPA-1) es fundamental para su futura comercialización. Esta producción se debe lograr al menor coste económico posible sin detrimento de la obtención de una alta población microbiana y del mantenimiento de la elevada efectividad en el control de los patógenos.

Los principales objetivos a realizar en la presente tesis doctoral han sido:

1. Determinación de medios de cultivo económicos (subproductos agroalimentarios) adecuados para la producción de la levadura *C. sake* (CPA-1).
2. Mejora nutricional del mejor medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1)
3. Determinación de las condiciones (temperatura, pH, actividad de agua y tiempo) más favorables para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).
4. Determinación de la dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) en manzanas "Golden Delicious" conservadas a 1 °C de temperatura y a diferentes relaciones de oxígeno y anhídrido carbónico.
5. Evaluación de la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1), crecida en los mejores medios de cultivo seleccionados.
6. Evaluación de la efectividad de la cepa de *C. sake* (CPA-1) producida en diferentes condiciones

de crecimiento (actividad de agua y tiempo).

Se seleccionaron un total de 8 subproductos agroalimentarios, en base a la bibliografía consultada, para determinar su potencial como medios de cultivo económicos, estos fueron: Levadura de cerveza, bagazo de cebada, concentrado de zumo de manzana, germen de cebada, melaza caña de azúcar, melaza remolacha azucarera, lactosuero y el derivado láctico. El germen de cebada fue el mejor medio de cultivo para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), aunque presenta el inconveniente de la mayor laboriosidad en su preparación y superior coste económico, respecto a los otros estudiados. Mientras que las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera fueron los mejores subproductos agroalimentarios ensayados, por su bajo coste, fácil preparación y elevado crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). Se realizó la combinación de los subproductos agroalimentarios estudiados, pero ésta no mejoró de forma apreciable el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), respecto a la obtenida en los mejores medios simples.

La mayor producción de la cepa de *C. sake* (CPA-1) se obtuvo en el medio de cultivo melaza caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l, a una temperatura entre 24 y 26 °C y en un intervalo de tiempo entre 40 y 42 horas. En estas condiciones la cepa presentó una alta efectividad en el control de *Penicillium expansum* en manzanas "Golden Delicious".

Al mismo tiempo, se determinó en los medios de cultivo de melazas, el rango de pH y actividad de agua en los cuales la cepa *C. sake* (CPA-1) tenía un buen crecimiento. El rango de pH fue de 3 a 9, utilizando como sustancia tamponante el ácido cítrico y el hidrógeno fosfato de sodio y la mínima actividad de agua que permitió un buen crecimiento fue de 0,97. En estas condiciones la cepa también presentó una alta efectividad en el control de *P. expansum* en manzanas "Golden Delicious".

En el estudio de la evolución de la población de la cepa *C. sake* (CPA-1) en la superficie de manzanas "Golden Delicious" conservada a 1 °C de temperatura y a diferentes condiciones de atmósfera controlada, se detectó una importante disminución de la misma en los primeros 15 días, aumentando la población de forma considerable a partir de ese momento. No se observaron diferencias apreciables entre las distintas condiciones ensayadas.

También se observó que la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el control del *P. expansum* no se modificó en función de la fase de crecimiento en que se determinó su efectividad.

El medio de cultivo de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea (98% de pureza) 1,2 g/l es el mejor de los ensayados, en cuanto a producción de la cepa *C. sake* (CPA-1) ( $4,7 \cdot 10^8$  ufc/ml) y coste (1,48 ptas/l).















