

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL



USO DE *Candida guilliermondii* COMO ALTERNATIVA BIOLÒGICA EN LA
DESHIDRATACIÓN DE UCHUVA (*Physalis peruviana*)

FABIO EDUARDO CAMERO
EDUARD VARGAS AVILA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

Bogotá D. C.
Noviembre de 2009

USO DE *Candida guilliermondii* COMO ALTERNATIVA BIOLÒGICA EN LA
DESHIDRATACIÓN DE UCHUVA (*Physalis peruviana*)

FABIO EDUARDO CAMERO
EDUARD VARGAS AVILA

APROBADO

Gerardo Moreno
Director

Andrea Aguirre rodriguez

Jurado 1

Jenny dueñas

Jurado 2

**USO DE *Candida guilliermondii* COMO ALTERNATIVA BIOLÒGICA EN LA
DESHIDRATACIÓN DE UCHUVA (*Physalis peruviana*)**

**FABIO EDUARDO CAMERO
EDUARD VARGAS AVILA**

Decano Facultad de Ciencias

Director de Microbiología Industrial

NOTA DE ADVERTENCIA

“Los conceptos y opiniones emitidos en este trabajo son responsabilidad del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”. Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946.

1. RESUMEN

Se evaluó el grado de deshidratación biológica que ocasionó la levadura *Candida guilliermondii* en una concentración de 10^6 cel/mL sobre frutos de uchuva (*Physallis peruviana*), en tres estados de maduración (verde, pintón y maduro) con un tiempo de aplicación por inmersión de 5 minutos. Se seleccionaron 900 unidades de uchuva; 450 para el tratamiento ambiente y las 450 restantes para el tratamiento con levadura. El diseño experimental consistió en realizar 18 grupos de uchuvas que presentaron un peso homogéneo y a un color característico para cada estado de maduración, según la NTC 4580, esta medida se realizó teniendo en cuenta parámetros de estadística descriptiva como media y desviación estándar que no superara el 5%. El periodo a evaluar fueron 30 días, las lecturas se realizaron cada 3 días en donde se evaluaron el pH, Sólidos Solubles Totales ($^{\circ}$ Brix), pérdida de peso y características físicas como color, apariencia, presencia de contaminación por hongos, pH, $^{\circ}$ Brix y peso.

Respecto a la pérdida de peso, el estado de maduración 4 tratado con levadura presentó la mayor pérdida con un 34.33% a los 12 días, seguido del estado de maduración 3 con una pérdida de 28.86% a los 12 días y finalmente el estado 5 presentó un 14% de pérdida en el fruto a los 9 días de estudio.

Por otra parte, el pH en el tratamiento ambiente realizado a los tres estados de maduración presentó un comportamiento similar, ya que este parámetro de estudio se mantuvo estable con unas leves disminuciones y aumentos desde el día 0 hasta el día 12, y seguido de un aumento de su valor hasta el día 21. En comparación al tratamiento ambiente; el pH del tratamiento biológico demostró que el estado de maduración con menor valor de acidez fue el 5 (maduro) con un pH entre 4.98 y 5.39, seguido del estado 4 (pintón) con una acidez entre de 4.95 y 5.17 y el estado 3 (verde) entre 4.84 y 5.12; indicando que este microorganismo tiene una acción importante en la modificación de pH del medio en donde se desarrolla.

Los Sólidos Solubles totales ($^{\circ}$ Brix) en el tratamiento ambiente se comportaron estables del día 0 al día 6; luego de este día hasta el día 15 disminuyó; y por último desde este día al día 21 se mantuvo constante y sin cambios importantes; a comparación del tratamiento biológico, el cual arrojó un descenso desde el día 0 hasta el 3 día de lectura y de este día al día 21 se comportó constante sin disminuciones o aumentos en los sólidos solubles totales; demostrando que *Candida guilliermondii* consumió los azúcares presentes en la uchuva generando una reducción de su concentración.

Las características organolépticas como olor, textura y color variaron en el transcurso del tiempo a medida que el fruto se deshidrató, se pudo evidenciar en el estado de maduración 3 frutos secos con colores verde – amarillento, en el estado 4 frutos secos con colores naranja- amarillos y cafés, mientras en el estado 5 frutos semisecos de colores naranja, cafés y negros.

Con estos datos se determinó, que de los tres estados de maduración analizados, el estado cuatro es el que mejor se deshidrató de manera biológica por acción de la levadura, debido a que presentó las mejores condiciones para el desarrollo y crecimiento de *Candida guilliermondii*.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente la deshidratación es un proceso y una alternativa tecnológica muy utilizada para conservar y darle una mayor vida útil a los alimentos, mediante la extracción y eliminación parcial del contenido de agua presente en el producto a tratar, esto debido a que es un elemento principal en el deterioro y cambios organolépticos ocasionados por reacciones bioquímicas y microbiológicas. Por ello, en la industria de alimentos se han utilizado varias técnicas y procesos que han permitido llegar a este objetivo principal (deshidratación), pero con ciertas desventajas entre las cuales están: altos costos económicos y energéticos y por otro lado con la frecuente utilización de agentes químicos, productos con un mayor riesgo de salud en el consumidor y así mismo la pérdida nutricional del alimento.

En este proyecto se buscó analizar una deshidratación biológica, utilizando para ello la levadura *Candida guilliermondii* como agente deshidratante, la cual permita conservar las características nutricionales del alimento (uchuva) sin ocasionar ningún tipo de riesgo en la salud humana, y además sea una alternativa económica rentable comparado con otros tratamientos.

Se trabajó con la Uchuva (*Physalis peruviana*), porque es la segunda fruta de exportación del país después del banano, principalmente a Europa y porque en la actualidad se han desarrollado pocos estudios y avances biotecnológicos que permitan obtener una mejor deshidratación de este fruto.

Actualmente no se ha encontrado en la literatura reportes de trabajos similares sobre la deshidratación de frutos en forma biológica, por ello surgió la necesidad y la iniciativa de realizar este proyecto, con el fin de avanzar y promover la investigación científica en el tratamiento de alimentos en poscosecha.

En la PUJ desde el año 2000 se ha estado investigado por parte del grupo UNIDIA (Unidad de investigación agropecuaria), del Departamento de Microbiología, la

importancia de *Candida guilliermondii* en la conservación de alimentos, siendo el presente trabajo una parte importante de un proyecto más amplio.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Este fruto por ser un producto de alta demanda tanto dentro como fuera del país, debido a su gran valor nutricional y medicinal, por tener un buen precio en el mercado y por su alto impacto nacional; ha ocasionado que actualmente sea utilizado en la producción de mermeladas, yogurt, dulces, conservas enlatadas, así como la utilización de conservantes y preservantes que alarguen su vida útil. Por otro lado en procesos de deshidratación físicos y químicos, entre las cuales están la deshidratación osmótica y la deshidratación por calor, lo que ha generado por un lado pérdidas nutricionales y organolépticas de esta fruta al ser sometida a diferentes y fuertes etapas durante el proceso y por otro lado que los precios sean mayores debido a los altos costos de las tecnologías utilizadas para estos procesos.

Debido a que la fruta a través del tiempo sufre cambios fisiológicos, físicos y biológicos drásticos que originan su pudrición al no recolectarse en un estado de maduración adecuado, ocasiona que comercialmente varios frutos se pierdan, por lo tanto son utilizados para la fabricación de mermeladas, dulces, jarabes, etc; por ello la importancia de esta investigación radica en dos puntos 1) Acudir a una alternativa biológica (levadura) para la conservación y deshidratación del fruto y 2) Determinar las variaciones que genera este microorganismo a los estados de maduración (verde, pinton y maduro) en el transcurso de 30 días.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la uchuva (*Physalis peruviana*) solo se ha tratado y comercializado en Colombia por deshidratación física y química, se quiere evaluar y encontrar la efectividad que tiene el proceso de deshidratación biológica hecha por la levadura (*Candida guilliermondii*) de manera *in vivo*, sin alterar o modificar las características organolépticas del producto (uchuva) y a su vez poder determinar cuál es el mejor estado de maduración del fruto en un tiempo de contacto con la levadura de 5 minutos. Además la levadura (*Candida guilliermondii*) presenta la posibilidad de ser controlador biológico de patógenos sobre esta clase de frutas. También aumenta la vida útil del fruto generando mayor fecha de vencimiento sin cambios organolépticos.

Se busca evaluar las variaciones en pH, ° Brix, peso y características organolépticas en 3 estados de maduración, ya que en estudios anteriores solo se habían analizado en un solo estado de maduración.

Por otro lado, se busca obtener un fruto en el que las características organolépticas sean llamativas y apetecidas por el consumidor; que conserve su parte nutricional, que biológicamente no sea contaminante, que no genere subproductos, no necesite conservantes y tenga una fecha de vencimiento a largo plazo.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Uchuva (*Physalis peruviana*)

Es una planta arbustiva o herbácea, perteneciente a la familia de las Solanáceas, que mide generalmente de 1 a 1.5 mts de altura. Presenta un crecimiento indeterminado y fuertemente ramificado desde la base. Cuenta con una raíz fibrosa, que se ha encontrado a más de 60 cm de profundidad en el suelo, posee un tallo algo quebradizo de color verde, con vellosidades de textura muy suave al tacto. Las hojas son alternas, simples, pecioladas, acorazonadas y altamente pubescentes con un tamaño entre 5 a 15 cm de largo y 4 a 10 cm de ancho; las flores son solitarias, hermafroditas y en forma de campana de cinco sépalos y cinco pétalos, con una corola amarilla y de forma tubular. (Fisher, 2005)

Es originaria de los Andes suramericanos y se caracteriza por tener un fruto, el cual es una baya carnosa y jugosa e forma de globo u ovoide con un diámetro que oscila entre 1.25 y 2.5 cm y con un peso entre 4 y 10 g. Su piel es suave, brillante y de color amarillo a anaranjado. Su pulpa presenta un sabor ácido azucarado (semiácido) y contiene de 100 a 300 semillas pequeñas de forma lenticular; además contiene altos niveles de minerales Fe y P, vitaminas A y C y fibra; se desarrolla dentro de una vaina fibrosa o membrana (cáliz), gamosépalo globoso acrescente que cubre el fruto hasta la madurez, el cual está formado por cinco sépalos que protege el fruto contra insectos, aves, enfermedades y condiciones climáticas extremas (radiación, cambios bruscos de temperatura, lluvias fuertes y granizadas), además sirve como fuente de carbohidratos durante los primeros 20 días del crecimiento del fruto y prolonga la vida poscosecha en 2/3 partes. (Avila J; 2006).

Características importantes a tener en cuenta en el fruto son el pH, y los °Brix. El pH en frutos maduros esta alrededor de 3.7 y de pintones en 3.5. Los °Brix en frutos maduros están entre 14.8 y 15.1 en frutos pintones, entre 14.1 y 14.5. Después del agua, los carbohidratos son los compuestos presentes en mayor proporción en la pulpa, vale destacar también los azúcares, pectinas y almidones. (Fisher, 2005).

De otra parte, se cuestiona el carácter climatérico de la uchuva, ya que el máximo de intensidad respiratoria, las mejores características sensoriales y la mejor relación de madurez (sólidos solubles totales/acidez total titulable) no coinciden entre sí. Por lo tanto, la uchuva se clasifica como un fruto intermedio, es decir entre comportamiento climatérico y no climatérico (Castro, *et al*, 2006).

Teniendo en cuenta que este fruto tiene estados de maduración se va a tener en cuenta la norma Icontec NTC 4580, que caracteriza seis (6) grados de madurez para los cuales se describen algunas características como se observa en las tabla 1.

Tabla 1. Características físico-químicas de los seis estados de madurez

Color	estado 1	estado 2	estado 3 (verde)	estado 4 (pintón)	estado 5 (maduro)	estado 6 (sobremaduro)
°Brix	11.4	13.2	14.1	14.5	14.8	15.1
% ácido cítrico	2.70	2.56	2.32	2.03	1.83	1.68
Índice de madurez	4.2	5.2	6	7.1	8.1	9

Fuente: NTC 4580.

5.2 Fisiología

Las frutas son organismos vivos aún después de su corte o cosecha, ya que mantienen los procesos fisiológicos como la respiración, transpiración y producción de hormonas de maduración como el etileno. Estos procesos ocurren a nivel celular, sin embargo cuando finalizan los procesos de transformación biológica, se inicia la eliminación de sustancias propias de la fruta como lo es la clorofila logrando un cambio organoléptico en el fruto. Estos procesos se inician en organelos celulares tales como los ribosomas, cloroplastos, una vez usados por la fruta se inicia un periodo activo de

senescencia o muerte celular (Fisher, 2005). En la Fig 1 se pueden observar los seis estados de maduración de la uchuva

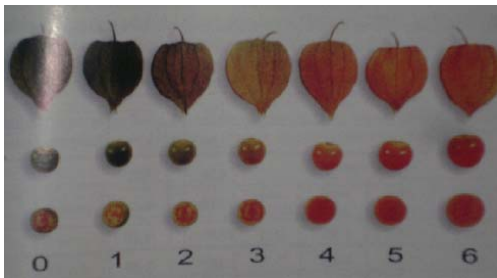


Fig 1 tabla de color del fruto de uchuva, basado en la NTC 4580 de Icontec 1999

Un aspecto importante en los frutos climatéricos es la respiración ya que es un proceso metabólico que se inicia con la adquisición de esqueletos carbonatados como azúcares, almidón y ácidos orgánicos, posteriormente los degrada por acción oxidativa logrando moléculas más sencillas tales como CO_2 y H_2O , para finalmente ser utilizadas en biosíntesis y así liberar energía en forma de ATP y Kcal. (Fisher, 2005).

5.3 *Candida guilliermondii*

El género *Candida* comprende una serie de levaduras unicelulares, que se multiplican por brotación o fisión.

Descripción Macroscópica: Estas levaduras poseen colonias brillantes, redondas pequeñas, y beige.

Descripción Microscópica: Son células ovaladas, presentan gemación bipolar, además retienen el cristal violeta en su pared clasificándolas como células gram positivas. Una prueba en especial respecto a otras especies es la prueba de patogenicidad, ya que carece de tubo germinal, en vez de esto posee una extensión filamentosa a partir la célula progenitora. (Escobar y Buitrago, 2009)

La prueba para la confirmación de género y especie se hizo en trabajos previos realizados por (Escobar y Buitrago, 2009), donde se logró la identificación bioquímica por medio del kit API 20C AUX, el cual consistía en la asimilación de azúcares de tal forma que por medio de un programa informático lo cual confirmó el género *Candida* y la especie *guilliermondii* con un 99.7% de certeza.

6. OBJETIVO GENERAL

- Utilizar la levadura *Candida guilliermondii* como alternativa biológica en el proceso de deshidratación de la Uchuva (*Physalis peruviana*)

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aplicar durante 5 minutos una concentración de levadura (*Candida guilliermondii*), a frutos de Uchuva en estados de maduración 3, 4 y 5.
2. Medir y analizar la respuesta de la Uchuva frente a una concentración establecida de la levadura durante un tiempo de experimentación de 30 días.
3. Determinar las variaciones de pH, sólidos solubles, peso y características organolépticas del fruto a lo largo de 30 días de experimentación.

7. METODOLOGÍA

7.1 SELECCIÓN DEL FRUTO

Se necesitaron alrededor de 1000 frutos de uchuva repartidos en 18 grupos con estados de maduración 3, 4 y 5, y distribuidos en dos tratamientos de la siguiente manera:

(A) **Con levadura (*Candida guilliermondii*):** Se utilizaron en total 450 unidades de uchuva, repartidas en 9 grupos de acuerdo a los tres estados de maduración, con tres repeticiones para cada estado de maduración y evaluadas en 10 lecturas durante 30 días de experimentación, a estas muestras se les denominó tratamiento con levadura.

(B) **Al ambiente:** De igual manera que en el tratamiento anterior, se utilizaron 450 unidades de uchuva, repartidas en 9 grupos, clasificándose, en los tres estados de maduración, con tres repeticiones cada una y evaluadas en 10 lecturas durante 30 días de experimentación, a estas muestras se les denominó tratamiento al ambiente.

Para ello, la Uchuva en los estados de maduración 3, 4 y 5 se obtuvieron de un proveedor y productor de Uchuva específico, ubicado en el municipio de Sylvania; teniendo en cuenta que las características físicas fueron similares como: textura, color, peso, olor, apariencia, tamaño, que se encuentren libres de plagas y enfermedades, que no estén maltratadas, y no tengan picaduras de insectos.

7.2 RECUPERACION *Candida guilliermondii*

7.2.1 Obtención de la levadura:

La cepa de la levadura *Candida guilliermondii* a utilizar, fue previamente aislada en el año 2000 en el laboratorio de Microbiología ambiental de la PUJ en frutos de tomate HIB. Se conservó en cultivos de uchuva en la EEJ. De acuerdo con lo reportado por Morales y Parrado (2009), se utilizó un volumen efectivo de trabajo de 4 L de medio de cultivo uchuva, con la levadura, para las 450 unidades de uchuva a tratar y a una lectura espectrofotométrica de 620 nm y una Absorbancia de la solución de 0.43.

7.2.2 Reconstitución de las cepas:

A partir de la cepa conservada en nevera y medio YGC, se tomaron varias azadas que se sembraron en cajas de petri en medio YGC, llevándose a incubar a 28-30°C durante 24h.

Posteriormente, se tomaron colonias crecidas en el medio de cultivo, con características microscópicas específicas de *Candida guilliermondii*, esto con el fin de hacer un raspado de las colonias y preparar una suspensión en un volumen de 5 mL de solución salina al 0.85% (p/v) hasta llegar a la concentración de 10^6 células/mL, (Tubo 3 de McFarland); realizando lectura en el espectrofotómetro a 620 nm hasta obtener una Absorbancia de 0.43. (Morales y Parrado, 2009)

7.2.3 Producción del Pre- inóculo:

En un erlenmeyer de 250 mL se adicionaron los 4 mL de suspensión de levadura que corresponden al 10% de inóculo con 36 mL de caldo estéril Uchuva (20 g/L) (Ward O, 1989) con el fin de obtener un volumen efectivo de trabajo de 40 mL, con relación $\frac{1}{2}$ al volumen total. Esta preparación de pre-inóculo se hizo en un shaker durante 24 h a 120 rpm con incubación de 28-30 °C

7.2.4 Producción del Inóculo:

Del pre-inóculo se tomaron 40 mL para agregarlos a 360 mL de caldo uchuva (20 g/L) en un erlenmeyer cuyo volumen total está en relación $\frac{1}{2}$ con el (Volumen Efectivo de

Trabajo) de 400 mL. Este inóculo se incubó en un shaker a 28-30 °C durante 24 h a 120 rpm

7.2.5 Etapa de Fermentación

Por último se adicionaron los 400 mL de inóculo a 3600 mL (3.6 L) de caldo Uchuva (20g/L), distribuyendo este volumen de manera igual y equitativa en 3 frascos schott de 2 L, manteniendo las condiciones óptimas de crecimiento como aireación, 120 rpm, temperatura de 28-30 °C, haciendo un seguimiento continuo del proceso.

7.3 TRATAMIENTO DE LA UCHUVA (*Physalis peruviana*) CON LA LEVADURA *Candida guilliermondii*.

Observando la norma NTC 4580 acerca de los estados de maduración de la uchuva se trabajaron los frutos que se encontraban en los colores 3, 4 y 5, teniendo en cuenta que cada uno tenía diferentes concentraciones de ácidos orgánicos (cítrico, málico y oxálico) y azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa). Luego de tener los frutos seleccionados en 9 grupos, con pesos y apariencia similar de color y maduración se sumergieron en la concentración de levadura, (proveniente de una lectura de Absorbancia de 0.43 nm en 8 horas de crecimiento, con una concentración aproximada de 4.3×10^6 cél/mL) con un tiempo de exposición de 5 minutos, esto con el fin de lograr la adherencia de la levadura (*Candida guilliermondii*) al fruto.

Una vez hecho este pasó, se dejaron secar los frutos en neveras térmicas en el laboratorio de Análisis Químico, se evaluaron y determinaron cambios de apariencia, textura, y color, haciendo muestreos y análisis cada 3 días, durante 30 días.

7.4 TRATAMIENTO DE LA UCHUVA (*Physalis peruviana*) AL AMBIENTE

Se colocaron los 9 grupos de uchucas en una superficie semiplana en neveras térmicas, separando los 3 estados de maduración, evaluando tres veces por semana por 30 días, las mismas variables se determinaron para las uchucas tratadas con levadura.

7.5 Análisis En Variaciones De Color Y Apariencia

Para el color y la apariencia se realizó un seguimiento antes y durante el proceso de deshidratación de la uchuva, anotando los cambios en las muestras que fueron analizadas bajo las condiciones de maduración ya mencionadas, cada tercer día, y a los tres estados de maduración para los tratamientos.

7.6 Determinación de peso

Las muestras seleccionadas (15 frutos por cada día de lectura), se llevaron a una balanza analítica y se determinó los pesos promedios de cada muestra seleccionada, para cada uno de los tratamientos.

7.7 Determinación de pH.

Se hizo una lectura inicial de pH de la siguiente manera: Se midió el pH de la Uchuva en su forma natural y de cada estado de maduración por triplicado; posteriormente se midió el pH del agua destilada en 3 lecturas y finalmente se calculó el pH de la fruta tomando 1g de ésta y macerándola en un crisol con 4 mL de agua destilada llegando a una relación 1:5 (agua:levadura) y así de esta manera tener los valores iniciales de pH de la uchuva.

En la segunda etapa las lecturas se realizaron así: Primero se leyó el pH del agua destilada que se utilizó en cada día de lectura (ya que este valor puede variar con el tiempo de almacenamiento), segundo se tomó 1g de fruta de cada estado de maduración y de cada tratamiento macerándolo con 4 mL de agua destilada haciéndolo por triplicado, con el fin de obtener el valor promedio del pH de la fruta deshidratada en cada día de lectura.

Estos valores se llevaron a una base de datos para su posterior análisis estadístico y elaboración de las gráficas respectivas.

7.8 Determinación de sólidos solubles

Según la NTC 4624 se toman de 1 a 2 gotas de jugo de la uchuva en los diferentes estados de maduración. Éstas se colocan sobre el prisma del refractómetro el cual se tapa cuidadosamente y se orienta hacia una fuente de luz para observar un campo visual y así determinar en la escala de sólidos solubles en grados Brix.

Según estudios anteriores, se observó que a medida que pasa el tiempo los frutos pierden agua lo que dificulta la lectura, por ello se optó por tomar de 1 a 2 gotas provenientes de la selección obtenida para el análisis de pH anteriormente mencionado, y colocar en el refractómetro 3 veces por muestra, para cada una de las 3 repeticiones y las tres lecturas semanales, durante 30 días.

7.9 ANALISIS ESTADISTICO

Para la selección de grupos de uchuvas se realizo análisis estadístico con la herramienta ANOVA, con el fin de establecer que las muestras no tuvieran diferencias estadísticamente significativas, ya que podrían afectar el resultado del estudio. Los datos trabajados en los 3 estados de maduración y las tres repeticiones no presentaron diferencias significativas al 5%. Por otra parte se analizaron los datos obtenidos de los tratamientos con las comparaciones múltiples Post hoc en especial la prueba de tuckey; esto se realizara en el programa estadístico *SPSS versión 11*, con el fin de determinar las diferencias estadísticas que se puedan presentar en las variables analizadas de cada uno de los tratamientos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 SELECCIÓN DEL FRUTO

De acuerdo con el análisis estadístico, los pesos de las uchuvas en estado de maduración 3, 4 y 5, evaluadas para los tratamientos ambiente y biológico, fueron normales sin presentar diferencias significativas, ya que la desviación estándar de cada grupo a tratar no supero el 5%; lo cual es lo ideal para obtener resultados confiables para la comparación de los tratamientos.

Adicional a ello, cada grupo de uchuvas seleccionado no presentó diferencias en sus características físicas como color, apariencia, olor, o maltrato (Fig 2.)

Los frutos del estado de maduración 3 tenían un color verde-anaranjado, los del estado 4 tenían un color más anaranjado que verde y los del estado 5 eran completamente anaranjados, teniendo en cuenta los colores según (Fischer G, 2005).



Fig 2. Selección del fruto: Para la selección se realizo con pesos semejantes, tipo de color acorde al estado de maduración y estado sanitario. A (estado No 3), B (estado No 4), C (estado No 5)

8.2 OBTENCIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA *Candida guilliermondii*

Se recupero la cepa de la levadura de un cultivo hecho en un medio YGC, observando colonias cremosas, redondas, pequeñas, y lisas; ya que este medio contiene glucosa como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno y el cloranfenicol como antibiótico para evitar el crecimiento de colonias bacterianas. (Merck, 2007)

Adicionalmente, en la coloración de Gram se visualizaron células, Gram positivas ovaladas en estado de gemación, sin la presencia de microorganismos contaminantes. (Fig 3)

La concentración de 10^6 cel/mL necesarias para el desarrollo del proyecto se igualo satisfactoriamente con ayuda del tubo 3 de Mcfarland, teniendo en cuanto la lectura en el espectofotometro a 620 nm hasta lograr una Absorbancia de 0.43, porque estudios previos de (Morales y Parrado, 2009), demostraron que esta concentración obtenida en un tiempo de 8 horas de crecimiento es la más adecuada para la obtención de la fase exponencial.

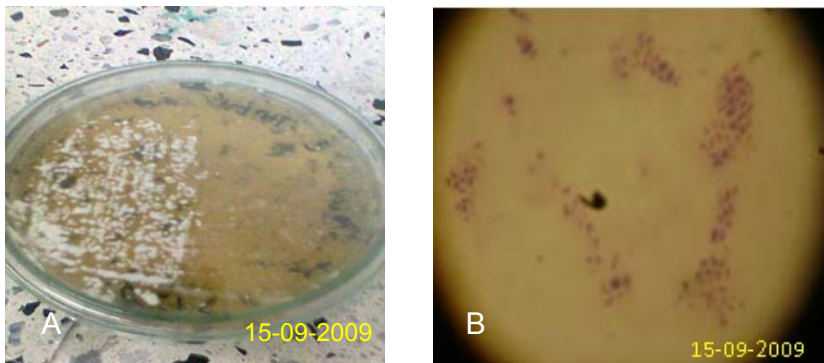


Fig 3. Obtención levadura: Figura A. *Candida guilliermondii* en medio YGC, Figura B. Coloración de Gram de la levadura.

8.3 PRODUCCION DE INOCULO

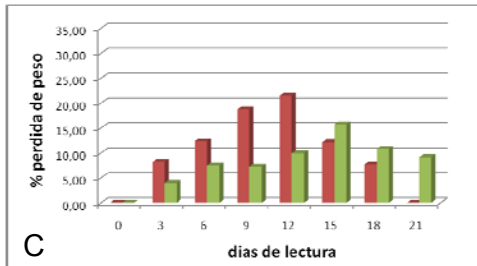
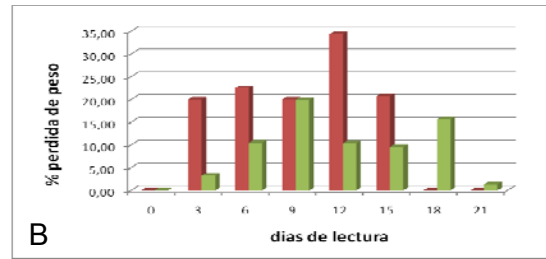
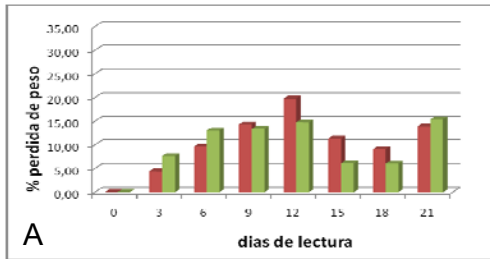
Las escalas de fermentación se realizaron de manera adecuada, tal cual se señalo en la metodología, debido a cálculos previos que demostraron que 4 L de caldo uchuva con levadura (*Candida guilliermondii*) eran necesarios para tratar las 450 unidades de uchuva durante 5 minutos. (Fig 4). Adicionalmente, con la coloración de Gram se evidenció la no presencia de contaminación generada por otro tipo de microorganismo en las escalas de fermentación.



Fig 4. Aplicación de la levadura (*Candida guilliermondii*) a frutos de Uchuva. A. se observa erlenmeyer de 500 mL. B. fracos schoot de 2000 mL. y C. Inmersión de la levadura a frutos de uchuva en caldo uchuva con levadura

8.4 VARIACIONES DE PESO CON EL TRATAMIENTO AL AMBIENTE Y CON LEVADURA (*Cándida guilliermondii*)

En los resultados del tratamiento ambiente se observo que la mayor pérdida de peso fue para el estado de maduración 4 con un 19.92% en el día 9, (ver *Grafica 1*), indicando que fue ocasionada por la transpiración y respiración; los cuales son los principales causantes de la pérdida de peso en los productos agrícolas, así mismo el déficit generado en la presión de vapor de agua entre el fruto y el ambiente generan grandes pérdidas de agua reduciendo de manera significativa el peso del fruto, por ello entre mayor sea este déficit, mayor será la pérdida de peso. (Lanchero O; ET AL, 2007). Dentro del proceso de respiración la fruta al no estar alimentándose de la planta debe consumir las reservas almacenadas en la vacuola para transformarla con ayuda de oxígeno en agua, CO₂ y energía.



Gráfica 1. Porcentajes de pérdida de peso de uchuvas sin capuchón en estados de maduración (A) (B) (C) por tratamiento al ambiente frente a tratamiento biológico (*Candida guilliermondii*).

Otro factor que influye en la velocidad de respiración es la temperatura debido a que el proceso de respiración se acelera o desacelera dependiendo de la variabilidad de la temperatura, ocasionando un rápido o lento deterioro de la fruta; por ello es recomendable mantener la uchuva a una temperatura alrededor de los 3°C máximo 7 °C. (Sierra, F 2002).

En el tratamiento con levadura se encontró un mayor porcentaje de pérdida de peso (deshidratación) por acción de *Candida guilliermondii*, en comparación con el tratamiento al ambiente, debido a que en el momento de aplicar sobre los frutos de estados de maduración 3, 4 y 5 ésta se encontraba en fase de crecimiento exponencial de 10^6 , provocando posiblemente una reducción del peso del fruto por acción del consumo de los azúcares presentes en la uchuva, principalmente la sacarosa, seguido de la glucosa y la fructosa. La mayoría de levaduras crecen mejor en medios en los que se dispone de agua en gran cantidad, y cabe anotar que casi todas requieren más agua que los hongos. El A_w (cantidad de agua libre en el alimento, es decir, el agua disponible para el crecimiento de microorganismos y para que se puedan llevar a cabo diferentes reacciones químicas) de las levaduras normales se encuentra entre 0.88 y 0.94 (Stewart & Russel 1991); además *Candida guilliermondii* tiene la capacidad de fermentar azúcares como glucosa, maltosa, sacarosa y galactosa, por ello con los resultados obtenidos se puede observar que el estado de maduración que presentó mayor porcentaje de pérdida de peso es el 4 con

un valor de 93.24% en comparación con el 3 que fue de 82.47% y el 5 con 80.72%. (ver gráfica 1)

Este resultado no se evidenció en el estado de maduración 3 y 5 posiblemente por dos razones: 1) Las altas concentraciones de almidón en el estado 3 evitan su consumo por parte de la levadura, ya que ésta no cuenta con las enzimas especializadas en el desdoblamiento e hidrólisis de este tipo de molécula, por ello debe esperar la hidrólisis de almidón generada por la acción de la hormona de maduración del etileno sobre los frutos, para así de esta forma consumir los azúcares disponibles y realizar su crecimiento y metabolismo celular; y 2) Posiblemente en el estado de maduración 5 las concentraciones de azúcares, ocasionaron que la levadura tuviera una represión por sustrato, porque no se tenía la concentración de células necesarias para el consumo y metabolismo de estas moléculas.

8.5 VARIACIONES DE pH CON EL TRATAMIENTO AL AMBIENTE Y CON LEVADURA (*Candida guilliermondii*)

Con los resultados de la gráfica 2 se pudo evidenciar que el pH en el tratamiento ambiente realizado en los tres estados de maduración estuvo entre los rangos, (4.80 a 5.90). Por otra parte en los tres estados de maduración el pH se comportó con pequeñas variaciones del día 0 hasta el día 12 (entre 4.70 y 5.20) y después de allí fue aumentando gradualmente hasta lograr mantenerse (entre 4.7 y 5.9); este fenómeno es debido a que en el transcurso del tiempo hay desdoblamiento y disminución de los ácidos orgánicos presentes en la pulpa de la fruta porque son tomados como sustrato respiratorio y como esqueletos de carbono para la síntesis de nuevos compuestos durante la maduración, lo cual ocasiona el aumento del pH; para finalmente generarse una reducción atribuida a procesos de neutralidad en el pH durante la senescencia del fruto. (Alvarado P, 2004). (Ver gráfica 2)

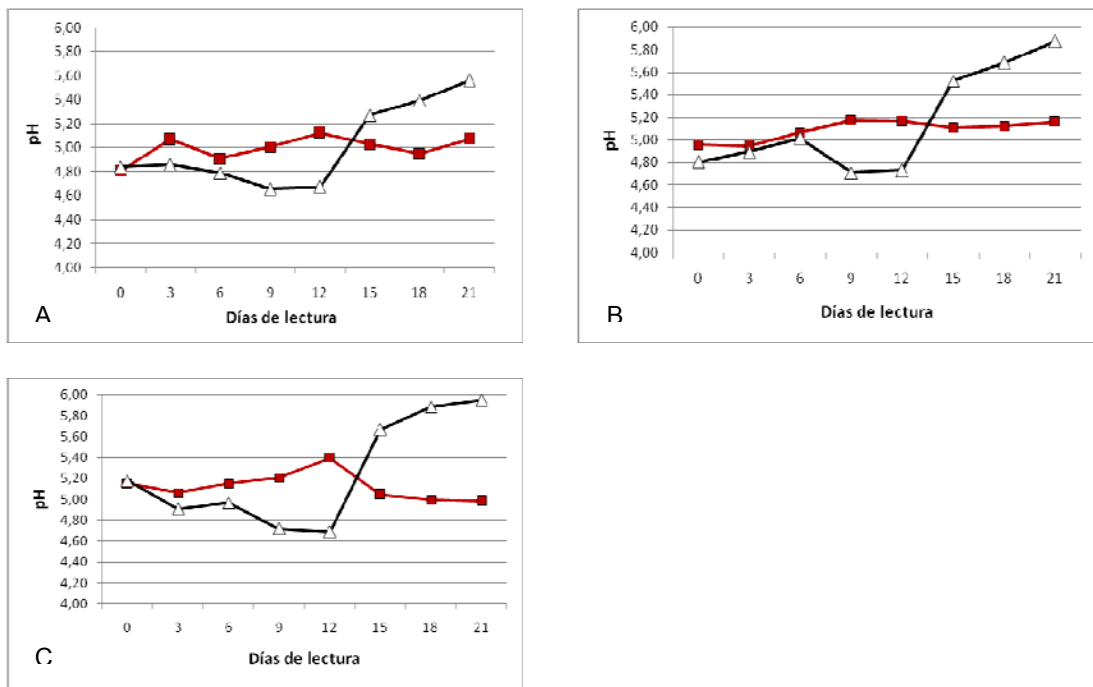
El pH celular es muy importante en la regulación del metabolismo. En frutos, más del 90% del volumen celular es ocupado por la vacuola, que es muy ácida y tiene un pH inferior a 5 (Espinosa, 2003).

Con el tratamiento de la levadura el comportamiento de pH fue constante en todos los días de deshidratación de los frutos, a comparación del estado de maduración 4, en donde se observa una leve disminución del pH después del día 12.

En el estado de maduración 3 y 4 el comportamiento del pH presento pequeños cambios en todos los días de análisis; en el estado 3 el pH estuvo entre 4.84 y 5.12 y

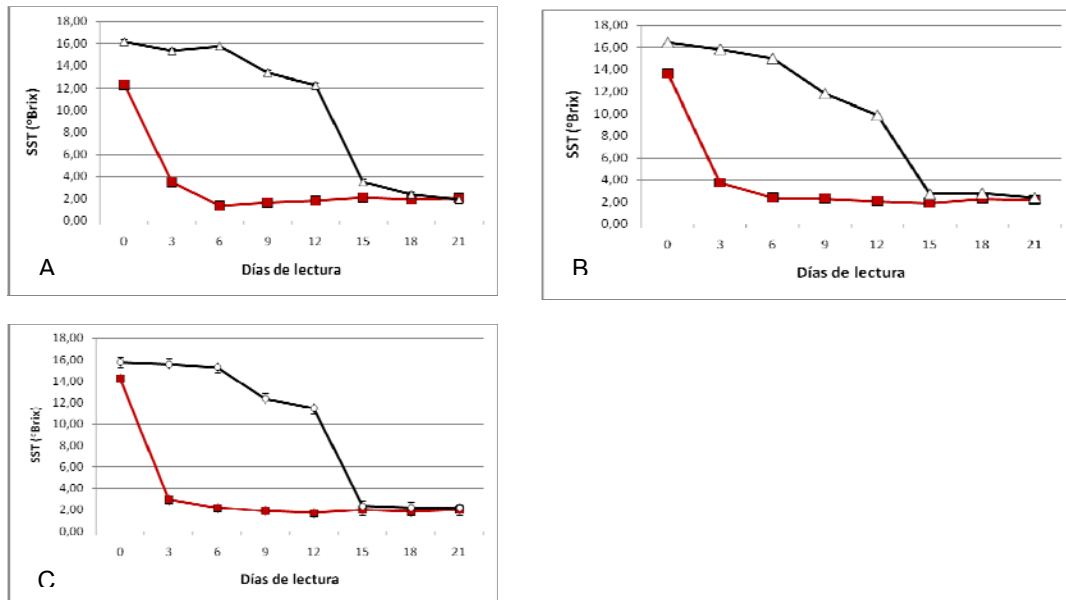
en el estado 4 entre 4.95 y 5.17. El fruto contiene dentro de su composición química natural y en mayor concentración ácido cítrico, el cual es uno de los intermediarios del TCA (Ciclo de Krebs); por ello posiblemente no se presentó aumento en la acidez sino una leve disminución, debido a la posible actividad realizada por las enzimas aconitasa e isocitrato deshidrogenasa propias del metabolismo de respiración celular y metabólico de *Candida guilliermondii*, (Córdoba A, 2004) lo cual le ayudo a reducir el ácido cítrico presente en el medio, para la transformación bioquímica de estos mismos y así ser utilizados como fuente de carbono.

Por otro lado, el estado de maduración 5 en el tratamiento biológico presentó similitudes con los estados de maduración 3 y 4, sin embargo tuvo diferencias notables después del día 12, en donde se ve una disminución apreciable en el pH, lo que ocasiono aumento en la acidez del fruto, esto probablemente por generación de subproductos ácidos por parte de *Candida guilliermondii*.



Gráfica 2. Evaluación de pH en los 2 tratamientos: Tratamiento biológico ■ y Tratamiento ambiente. △

8.6 VARIACIONES DE SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES ($^{\circ}$ Brix) CON EL TRATAMIENTO AL AMBIENTE Y CON LEVADURA (*Candida guilliermondii*)



Grafica 3. Variaciones de Sólidos Solubles Totales ($^{\circ}$ Brix) de uchuvas en estados de maduración A)3, B)4 y C)5, por tratamiento al ambiente Δ frente al tratamiento biológico (*Candida guilliermondii*) \blacksquare

En la Grafica 3, se observan en los tres estados de maduración con el tratamiento ambiente un comportamiento estable en la concentración de SST del día 0 a 6, y a partir de este día comienza a sufrir un decrecimiento hasta el día 15, y luego hasta el día 21 se mantiene constante; este resultado comparado con (Fischer y Martínez, 1999) y (Hernández, 2001)., no es el esperado, ya que el comportamiento de los sólidos solubles es ir en aumento a medida que el fruto va madurando, debido a que hay un aumento de azúcares por producto de la hidrólisis de almidón y/o síntesis de sacarosa, y la oxidación de ácidos consumidos en la respiración (desdoblamiento de sustancias de reserva).

Por ello, en los resultados de este proyecto los valores de $^{\circ}$ Brix disminuyeron de manera notable, posiblemente por el agua y la dilución a la que fue sometido cada fruto, o también a la alta intensidad respiratoria que sufrió el fruto desde el día 6 hasta el día 15, a causa de las variaciones ambientales como temperatura, presión, y

humedad del sitio en donde se encontraban los frutos; por las neveras térmicas que no estaban selladas ni aisladas, y por las corrientes de aire generadas en el laboratorio a causa de la entrada y salida constante por las puertas de acceso.

























Probablemente algunos días de bajas temperaturas del laboratorio de análisis, provocaron que el metabolismo y síntesis de azúcares se frenaran y los que estaban disponibles fueran utilizados en otros procesos celulares para mantener el desarrollo y sostenimiento del fruto (Alvarado P, 2004); por otra parte algunos aumentos en la temperatura aceleraron el proceso de respiración del fruto, causando que los sólidos solubles disminuyeran debido a que la mayoría de los azúcares fue utilizado en el proceso respiratorio. (Alvarado P, 2004).

Cabe resaltar, que principalmente los estados de maduración 3 y 4, sufrieron posiblemente efectos de los cambios de temperatura en el laboratorio de experimentación provocando que la fisiología del fruto en especial el etileno promoviera la acción de las hidrolasas sobre la pectina de la pared celular causando el ablandamiento de la pulpa (Fischer G, 2005) y posiblemente el consumo más rápido de azúcares disponibles por el mismo fruto. Este resultado no se comparte con (Novoa ; ET AL, 2006), quien afirma que a medida que los frutos maduran, los contenidos de sólidos solubles aumentan por los procesos de hidrólisis del almidón en azúcares más simples, siendo ello una característica importante en las uchuvas del ecotipo de Colombia.

La uchuva analizada en los tres estados de maduración frente al tratamiento con levadura presentó del día 0 a 6 una disminución en la concentración de SST, demostrando la alta acción de ésta sobre los azúcares disponibles del fruto (sacarosa con 2.5 veces más de concentración que la glucosa y la fructosa), ya que se encontraba en fase exponencial y por lo cual provocó el consumo acelerado de azúcares para su metabolismo y tasa de duplicación celular; de otra parte probablemente los frutos de uchuva presentaron distintos ecotipos, cambiando la acción del microorganismo, debido a que este no actúa de la misma manera. La maduración del fruto de uchuva se ve influenciada principalmente por la concentración de SST. Los grados Brix (sólidos solubles totales) están constituidos por un 80 a 95% por azúcares, esta medida se ve asociada con los azúcares disueltos en el jugo celular. (Fischer, 2005)

8.7 VARIACION DE COLOR

Los cambios de color de los frutos de uchuva a través del tiempo (Fig 4-5), se compararon con la tabla de coloración de las uchucas descrita en el (CODEX stan 226-2001). Comparando esta norma Codex y la tabla de colores descrita por (Fisher, 2006) se considera que el mejor estado de maduración que conservo las características de un fruto agradable para el consumidor, con una aroma característico, y con una textura arrugada propia de un fruto deshidratado fue el estado maduración No 4, en los dos tratamientos.

0	3	6	9	12	15	18	21
							
A							
0	3	6	9	12	15	18	21
							
B			c				
0	3	6	9	12	15	18	21
							
C							

























							
							
							

Fig 4. Evaluación de colores del Tratamiento ambiente a través del tiempo: **A.** estado de maduración No 3, **B.** estado de maduración No 4. y **C.** estado de maduración No 5.

Fig 5. Evaluación de colores del Tratamiento biológico a través del tiempo: **A.** estado de maduración No 3, **B.** estado de maduración No 4. y **C.** estado de maduración No 5.

8.8 RECUESTO EN CAMARA DE NEUBAUER

El recuento de células en cámara de Neubauer de la levadura *Candida guilliermondii* (Figura 5) en estado de maduración 4, evaluado en las lecturas arrojo como resultados: 1) Una concentración del día 0 al 12 entre $25 \cdot 10^6$ y $30 \cdot 10^6$ cel/mL, 2) Del día 12 al 18 un crecimiento entre $45 \cdot 10^6$ y $49 \cdot 10^6$ cel/mL y 3) Después del día 18 una \downarrow o decrecimiento en el número de células entre $15 \cdot 10^5$ y $19 \cdot 10^5$ cel/mL; indicando que en los 3 estados de maduración la levadura presentó un crecimiento, en donde se puede observar al comienzo de crecimiento la fase exponencial, luego una fase estacionaria y por último la etapa o fase de muerte.

Esto se debe a que el microorganismo utilizó los frutos de uchuva en sus 3 diferentes estados de maduración como fuente principal de nutrientes para su desarrollo y crecimiento celular al comienzo de los días, luego se mantuvo con las reservas celulares propias y por último al no tener fuentes para obtener los nutrientes comenzó a decrecer en el número de células.

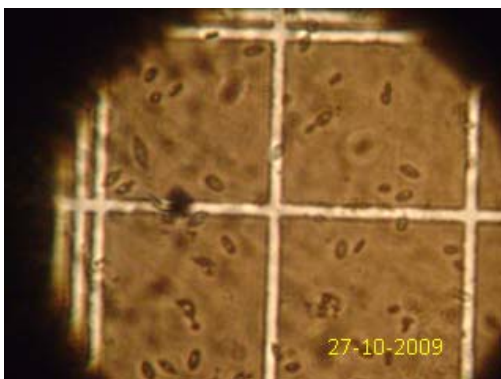


Fig 5. Recuento cámara de Neubauer

8.9 ANALISIS ESTADISTICO

Por medio de la herramienta estadística Anova, se determino que no hay diferencia significativa entre los datos de los pesos de los frutos, pH y SST ($^{\circ}$ Brix), frente al tratamiento al ambiente y a la levadura *C. guilliermondii*, presentándose un comportamiento normal de los datos obtenidos.

No se encontraron diferencias significativas entre valores de pH, $^{\circ}$ brix y pérdida de peso, ya que todos dieron valores de significancia menores del < 0.05 .

9. CONCLUSIONES

1. Los Grados brix no tuvieron el comportamiento esperado en este proyecto, ya que la literatura afirma que estos aumentan a medida que pasa el tiempo, sin embargo en este estudio el comportamiento fue descendente, por ello una justificación para este resultado es la dilución con agua que se utilizó para este análisis, o el ecotipo de uchuva que se trabajó.
2. El pH en los tres estados de maduración tratados al ambiente fueron de comportamiento similar, mientras que con el tratamiento biológico se encontraron variaciones dentro del rango de 4.81 – 5.17.
2. El porcentaje de pérdida de peso demostró que el estado de maduración 4 tuvo la mayor deshidratación con un 115%, seguido del estado 5 con 78% y el estado 3 con 75%.
3. El tratamiento biológico en el que mejor funcionó la deshidratación fue en el estado de maduración No 4, porque fue el que presentó mejores características visuales, de aroma y textura.
4. El tiempo de inmersión por 5 minutos tuvo buenos resultados respecto a la tasa de deshidratación, ya que se cree que fue un tiempo óptimo para que las levaduras se adherieran a la superficie del fruto.

10. RECOMENDACIONES

1. Es indispensable que se manejen diluciones de menor orden en la toma de grados brix para evitar posibles errores de lectura en próximos estudios, además sería de gran utilidad la búsqueda de metodologías alternas con menos error experimental, de tal manera que los resultados esperados sean acordes a los de la literatura.
2. Al momento de realizar una lectura verificar que estén calibrados los equipos, conocer con anterioridad el tipo de análisis que se va a realizar y tener de antemano posibles soluciones a percances inesperados como falta de material, de reactivos, de implementos, entre otros.
3. Revisar constantemente que las variaciones físicas del lugar de análisis no presenten continuas variaciones, ya que esto puede alterar y en gran parte afectar los resultados.
4. Es necesario determinar la concentración final de azúcares en los frutos, para evidenciar la acción de este microorganismo y por ende la deshidratación.

11. REFERENCIAS

Azcón, Bieto. Fundamentos de fisiología vegetal, Ed McGraw-Hill, 2008, 651 p.

Alvarado, P. Efecto de un tratamiento de frío (a 1,5° C) y la humedad relativa sobre las características físico-químicas de frutos de uchuva *Physalis peruviana* L. durante el posterior transporte y almacenamiento. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2004

Avila, J. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2006

Castro, A. Estudio de la cinética de deshidratación osmótica de la uchuva (*Physalis peruviana* L.), Dpto de Ingeniería de Alimentos Universidad Jorge Tadeo lozano, 2006.

Cordoba, A. Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas, Revista colombiana de biotecnología VOL. VI No. 2 Diciembre 2004 31-36

CODEX STAN 226 Norma del codex para la uchuva, codex stan 226-2001, emd. 1-2005, 4 p.

Espinosa, K. Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva (*Physalis peruviana*), Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 2003

Fischer, G. Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia, 2005, Ed universidad nacional de Colombia, 221 p.

Gutiérrez, T. Determinación del contenido de ácido ascórbico en uchuva (*physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Universidad del Valle, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Contaminantes Ambientales, Rev Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol 5 No.1 Marzo 2007.

Hernandez, A. 2001. Manejo poscosecha. pp. 109-127. En: Flórez, V.J.; Fischer, G.; Sora, A.D. (eds.). Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 175 p.

Lanchero, O. Fisiología de frutos climatéricos en la región de Antioquia, universidad nacional sede Antioquia 2007.

Mazorra, M. Aspectos anatómicos de la formación y crecimiento del fruto de uchuva *Physalis peruviana* (solanaceae), Rev Biológica Colombiana, Vol. 11 No. 1, 2006 69 – 81; 2007

Novoa, R.H.; Bojaca, M.; Galvis, J.A.; Fischer, G. 2006. La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12°C (*Physalis peruviana* L.). Agron Colomb 24(1): 77-86.

NTC 4580, ICONTEC; 1999.

Romero J. 2002. Efecto antagónico de *C. Rugosa* sobre microorganismos contaminantes de la uchuva nativa *Physalis peruviana*. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 88 p.

Sierra L. E. El cultivo del banano: producción y comercio. Medellín: Graficas Olímpicas, 1993. 680 p.

Silva, T. Diagnostico de enfermedades de *Physallis peruviana* en Medellin. Universidad de Antioquia. 2005.