

**REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA LITERATURA SOBRE LOS
METABOLITOS GENERADOS POR LA LEVADURA**

Candida guilliermondii

SAUK NARANJO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para obtener el título

MICROBIOLOGÍA AGRICOLA Y VETERINARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGÍA AGRICOLA Y VETERINARIA

2011

CONTENIDO

Pág

2.	MARCO TEÓRICO	
2.1	CEPA <i>Candida guilliermondii</i> AISLADA DE LA PONTIFICA UNIVERSIDAD JAVERIANA	
2.1.1	Metabolitos	
2.1.1.1	Xilitol	
2.1.1.2	El acetato de etilo	
2.1.1.3	Isobutanol	
2.1.1.4	Isopentanol	
2.1.1.5	Alcohol amílico activo	
2.1.1.6	2-Fenil etanol	
2.1.1.7	Ácido 2-metilbútrico	
2.2	CONTROL BIOLÓGICO	
2.2.1	Agentes de biocontrol disponibles en el mercado internacional	
2.3	MICROHONGOS CONTAMINANTES	

DE POSCOSECHA

2.3.1 *Alternaria* spp

2.3.1.1 **Toxinas**

2.3.1.2 **Fitopatología**

2.3.2 *Penicillium* spp

2.3.2.1 **Morfología**

2.3.2.2 **Micotoxinas**

2.3.3. *Aspergillus* spp

2.3.3.1 **Micotoxinas**

2.3.4 *Botrytis* spp

2.3.4.1 **Fitopatología**

2.3.4. *Rhizopus* spp

2.3.4.1 **Fitopatología**

2.4 **BIORREACTORES**

2.4.1 **Oxígeno**

2.4.2 **Azúcares**

2.5 **FILOSFERA**

- 2.5.1 Radiación ultravioleta**
- 2.6 ATMÓSFERAS CONTROLADAS**
- 2.6.1 Ventajas e inconvenientes de la atmósfera controlada**
- 2.6.2 envasado en atmósfera controlada (EAC)**
- 2.6.3 Envasado en atmósfera modificada (EAM)**
- 2.6.4 El envasado mediante películas plásticas;**
- 2.7 LA NARANJA**
- 2.7.1 Clasificación taxonómica**
- 2.7.2 La naranja y su salud**
- 2.7.3 Cosecha**
- 3. JUSTIFICACIÓN**
- 4. OBJETIVOS**
- 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**
- 5. MATERIALES Y MÉTODOS**
- 5.1 MATERIAL VEGETAL**
- 5.2 MATERIAL CELULAR**
- 5.3 MATERIAL QUÍMICO**
- 5.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO ÓPTIMO**

- 5.4.1 Evaluación del crecimiento optimo**
- 5.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO**
- 5.7 BIOENSAYOS (*in vivo*)**
- 5.7.2 Protección con Etanol**
- 5.7.3 Protección mixta**
- 6. DISCUSIÓN**
- 7. CONCLUSIONES**
- 8. BIBLIOGRAFIA**

INTRODUCCIÓN

Las levaduras reconocidas hasta el momento son alrededor de 700 especies, muchas de ellas, usadas en la industria biotecnológica en áreas como las tecnologías del medio ambiente, investigación biomédica, industrias para el cuidado de la salud, la agroindustria entre las cuales están el control biológico de plagas en post cosecha de frutas, en procesos de fermentación para producción de diferentes tipos de alcoholes y, de forma más tradicional en las industrias panaderas (Graeme 1998).

Para obtener información específica y detallada es necesario utilizar las bases de datos de artículos científicos que contienen información de vanguardia en los temas de conocimiento necesarios, así mismo investigaciones previas realizadas en la Pontificia Universidad Javeriana. De la misma forma, las patentes que permiten observar los avances tecnológicos más recientes, ya que esta información no se hace pública en otros medios.

Los alimentos de origen vegetal han sido propensos al tiempo y a las condiciones de almacenamiento durante toda la historia humana, no obstante el desarrollo de productos químicos nocivos (plaguicidas) propició la producción a gran escala de este tipo de alimentos, aunque la misma toxicidad que poseía para los microorganismos también afectaba la salud al ser consumidos, de esta forma entidades como la FAO y la OMS a través del *codex alimentarius* restringieron su uso por ser potenciales agentes oncogénicos. El control biológico nace como alternativa natural para conservar por periodos más largos este tipo de productos, abriendo la posibilidad de utilizar agentes que por sí mismos están mejorando su capacidad antagónica.

Basados en los diferentes aportes dados por los estudiantes y docentes de la Pontificia Universidad Javeriana sobre los efectos antagónicos presentes en la levadura *Candida guilliermondii* y las actualizaciones realizadas de nuevos artículos expuestos internacionalmente sobre los alcances y los futuros prometedores que ofrece esta levadura al salvaguardar alimentos vegetales sin procesar por largos períodos sin la incertidumbre de tener enormes pérdidas por putrefacción microbiana y sin el uso de productos químicos que puedan comprometer la salud

humana y su medio ambiente. Mediante esta monografía se pretende poner a disposición un modelo práctico y claro para ser llevado a pruebas tanto en laboratorio como en campo por entes interesados en retomar esta tesis, creando un modelo de evaluación del potencial de la cepa sobre diferentes cultivos de la región para ser aplicado tanto postcosecha como en precosecha.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación que se adelanta desde el año 2000 por parte del grupo de investigación UNIDIA y que tiene que ver con el uso de la levadura *C. guilliermondii* en la deshidratación de frutos maduros.

Para el inicio de esta revisión el primer paso fue definir las palabras clave para la búsqueda de información, ver tabla 1.

Tabla 1: Relación de palabras clave para la búsqueda de la información en bases de datos, con respecto a los metabolitos producidos por *C. guilliermondii*.

Español	Inglés
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
Enzima	Enzyme
Acetato de etilo	Ethyl acetate
Xilitol	Xilitol
Isobutanol	Isobutanol
Isopentanol	Isopentanol
2-metil 1- butanol	2 methyl 1- butanol
2 feniletanol	2-phenylethanol (Phenethyl alcohol)
Acido 2- metil butírico	methyl butyric acid
Ruta metabólica	Metabolic pathway

2. MARCO TEÓRICO

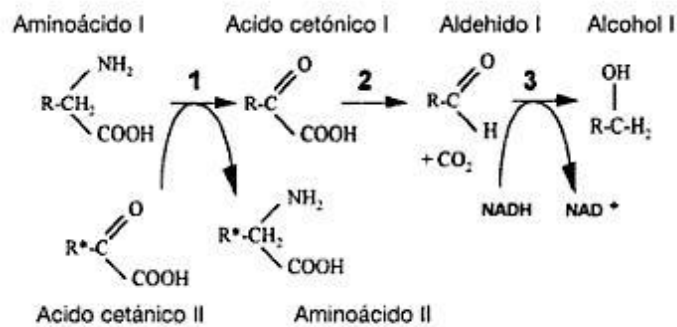
2.1 CEPA *Candida guilliermondii* AISLADA DE LA PONTIFICA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Candida guilliermondii, es considerada una levadura emergente de América, es comúnmente asociada con micosis no invasivas o invasivas en pacientes inmunodeprimidos. Sin embargo, la cepa de *Candida* que se aisló en el año 2000 sobre el interior de los frutos de tomates heteroinjertados (HIB) en la Pontificia universidad javeriana, dieron como resultado que no es patógena para el ser humano, lo que dio inicio a investigación en frutos de tomate, banano, uchuva, piña, mango y manzana (Ovando, 2010). La cepa aislada fue analizada bajo pruebas bioquímicas clasificándola como *C. inconspicua*, (Ortegón y Ramírez, 2000) aunque en otros trabajos un año más tarde fue catalogada como *C. rugosa* (Torres 2001. Ortegón & Ramirez 2001) fecha en la cual se descubrió que la levadura era antagonista de microorganismos presentes en el fruto de uchuva (Romero. 2001).

Para el año 2008 se elabora una curva de crecimiento reclasificándola con un 99,7% de certeza en el API 20C AUX web como *Candida guilliermondii* (Escobar y Buitrago, 2008). El análisis por cromatografía líquida detectó la presencia de metabolitos en la superficie del tomate entre estos fueron acetato de etilo, seguido por el xilitol (Albarracin y Barreto. 2003). Su uso más reportado es la formación del xilitol a partir de azúcares, además de los efectos antagónicos, en gran variedad de frutos (Wilson, 1989).

2.1.1 Metabolitos; la levadura ha sido utilizada en el laboratorio y semi-comercialmente para el control biológico de enfermedades post-cosecha en diferentes frutas y verduras por su capacidad inhibidora, un ejemplo claro de su uso ha sido para el control *Botrytis cinerea* cuyo antagonismo se debe por la excreción de metabolitos cuando fue aplicado sobre manzanas (Filonow, 1996), también se especuló que su efecto biocontrolador se debe a la capacidad rápida de crecimiento frente a sus competidores, limitando el espacio y la disposición de nutrientes (Salikarias, 2002).

En cuanto a los alcoholes superiores, en las levaduras, la mayor parte, derivan directamente de los esqueletos carbonados de los aminoácidos asimilados por esta durante la fermentación alcohólica. El grupo aminado del aminoácido, es quitado por transaminación, y el ácido cetónico correspondiente, es enseguida descarboxilado en un aldehído (figura 1).



(1) : reacción de transaminación, (2) : reacción de descarboxilación, (3) : reacción de deshidrogenación.

Figura 1. Esquema de vía metabólica de síntesis de los alcoholes superiores a partir de aminoácidos y de los ácidos cetónicos correspondientes (Flanzy, 2003).

Este aldehído puede entonces ser reducido por la enzima alcohol deshidrogenasa característica de la fermentación alcohólica. Conduciendo así a la formación de un alcohol superior que posee un carbono de menos que el aminoácido de origen.

Este, no es el único modo de síntesis de alcoholes superiores, ya que estos se pueden producir también en ausencia de catabolismo de aminoácidos (especialmente en fase estacionaria). En este caso, durante la biosíntesis de un aminoácido, se descarboxila un ácido cetónico, que contiene un átomo de carbono más que el alcohol superior correspondiente, y después se reduce (Flanzy, 2003).

Se ha puesto en evidencia otra vía de síntesis de los alcoholes superiores ramificados: vías que harían intervenir directamente actividades enzimáticas específicas de los aminoácidos ramificados. Los principales alcoholes sintetizados durante la fermentación alcohólica son: isobutanol, alcohol amílico e isoamilico y feniletanol. Existe un parentesco directo entre un alcohol superior y el aminoácido del que descende. Sin embargo es difícil ligar la síntesis de un alcohol superior particular con una composición determinada del medio o del mosto en el aminoácido correspondiente. Además se ha puesto en evidencia una relación inversa entre riqueza en nitrógeno asimilable del medio y contenido de alcoholes superiores, hecho verdaderamente imputable a una represión catabólica por el nitrógeno de las actividades de transaminación. En medios de cultivo o en mostos, una clarificación o

tratamiento para disminuir la tasa de materias insolubles (especialmente proteínas), puede mejorar la producción de alcoholes superiores.

Durante la síntesis de alcoholes superiores a partir de los aminoácidos, las reacciones de transaminación, generan numerosos reajustes de los esqueletos carbonados y especialmente de los ácidos cetónicos (figura 2).



Figura 2. Esquema de filiación entre aminoácidos, ácidos cetónicos, alcoholes superiores y ésteres (Flanzy, 2003).

Estos ácidos cetónicos son luego secretados en el medio exterior, o descarboxilados y después reducidos en el alcohol superior correspondiente. Esta vía de síntesis juega un papel importante en el metabolismo fermentativo, permitiendo la re oxidación del NADH. Al

principio de la fermentación, cuando todos los aminoácidos necesarios no ha sido absorbidos por la levadura, los ácidos cetónicos y los alcoholes superiores correspondientes son sintetizados a partir del metabolismo de los azúcares vía piruvato.

En cuanto a los ésteres, son producidos por una reacción enzimática poniendo en juego los derivados acil grasos del Coenzima A y los alcoholes libres. La síntesis de los ésteres se basa principalmente en las enzimas de tipo alcoholacetilCoenzimaA transferasa. Una de estas enzimas (la acetilcoenzimaA transferasa), ha sido purificada y estudiada en detalle, es capaz de sintetizar acetatos de etilo, de propilo o iso-amilo. Esta muestra siempre una afinidad fuerte por los alcoholes isoamilicos. La producción de ésteres de acetato durante la fermentación, está directamente unida al nivel de actividad de actividad de alcohol acetil transferasa en la célula y a las concentraciones respectivas de los alcoholes precursores. En general la presencia de ácidos grasos insaturados en el medio o mosto, conduce a una estimulación de crecimiento celular en anaerobiosis, y una caída de la producción de ácidos grasos de cadena corta y de los ésteres etílicos correspondientes (Flanzy, 2003).

2.1.1.1 Xilitol; D-xilitol se produce industrialmente por la reducción química de la D-xilosa derivados principalmente de hidrolizados de biomasa fotosintética. La biomasa fotosintética es el recurso renovable más abundante en el mundo, que consiste en celulosa, hemicelulosa, lignina y una baja cantidad de pectina, proteínas, extractos y cenizas (ver Figura. 1). La hemicelulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, lo que representa 19 a 34% de la biomasa fotosintética, justo al lado del biopolímero más abundante: la celulosa (34-50%). La Hemicelulosa es un buen recurso para la producción de D-xilitol, y se compone de D-glucosa, D-galactosa, manosa-D, D-xilosa, D-arabinosa y ácido D-glucurónico con cadenas laterales acetilo. En materiales a base de biomasa, los tres componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) están fuertemente entrelazados químicamente (Pérez, Muñoz & Rupia). Con el fin de obtener azúcares puros fermentables, la D-xilosa, biomasa de estructura complicada, es necesario el tratamiento previo de los materiales por procedimientos químicos (Liaw, Chen & Chang, 2008) o métodos por hidrólisis biológicos Zhu, O'Dwyer, Chang (2008). En 1970, el método de cromatografía de escala industrial se ha desarrollado en Finlandia, la D-xilosa pura se separó de la hemicelulosa. Posteriormente, D-xilitol puede ser producido a partir de D-xilosa a

través de la hidrogenación catalítica, en presencia de un catalizador de níquel a altas temperaturas (80 - 140 ° C) y con una presión (hasta 50 atm) Härkönen, Nuojua & Eri (1979). La tasa de conversión del xilano (polímero de la D-xilosa) a D-xilitol alcanza el 50% - 60% Hyvönen, Koivistoinen & Voirol (1982)

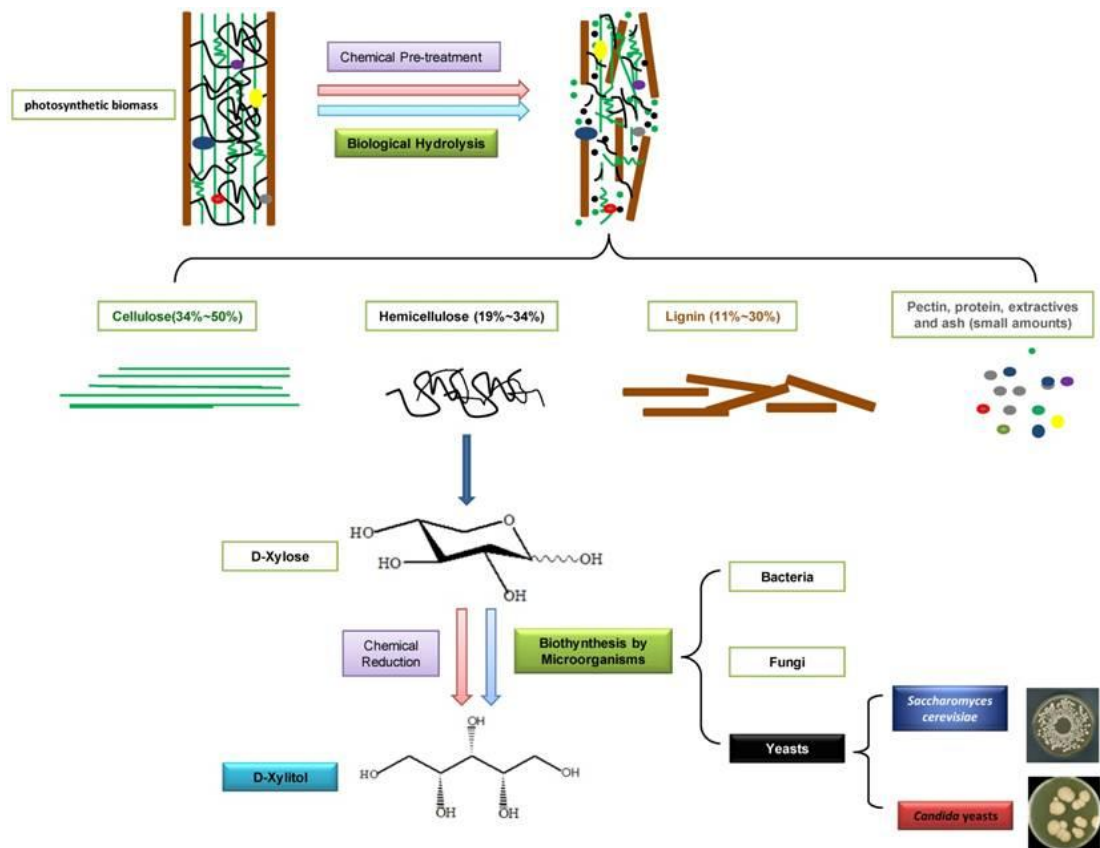


Figura 3. Diagrama de la producción biológica de xilitol a partir de la descomposición de biomasa vegetales. (Chen, Jiang, Chen, Qin. 2010)

Las levaduras *Candida* spp. fueron consideradas como las mejores candidatas para la ingeniería metabólica que puedan ofrecer con respecto a otras levaduras como la cepa recombinante *Saccharomyces cerevisiae*, debido a sus características naturales de consumir D-xilosa y mantener el equilibrio de oxido-reducción en la acumulación de D-xilitol. Sin embargo, su aplicación se limitaba en la industria alimentaria debido a la naturaleza patógena oportunista que presentan algunas especies de *Candida* spp. (Chen, Jiang, Chen & Qin. 2010)

En las bacterias, la conversión de la D-xilosa a D-xilitol es catalizada por la xilosa isomerasa en un solo paso. Esta xilosa isomerasa también se detectó en algunas levaduras y mohos, como *C. boidinii*, *Malbranchea pulchella* y *Meurospora crassa* [Banerjee S, Archana A, Satyanarayana. 1994 – Rawat, Phadtare, Deshpande, Rao 1996]. Sin embargo, en la mayoría de las levaduras y los hongos, la conversión de la D-xilosa a D-xilitol necesita dos pasos, un paso de reducción seguida de una etapa de oxidación. En estas levaduras y hongos, la D-xilosa se redujo primero a D-xilitol por la acción de xilosa reductasa, pasando de NADH o NADPH-dependiente (XR), el resultado es la molécula D-xilitol el cual se segrega a uno o más oxidados de D-xilitol en xilitol deshidrogenasa

NAD o NADP-dependiente (XDH). Estas dos reacciones se consideraron las medidas que limitan la velocidad de fermentación de la D-xilosa y la producción de D-xilitol. Algunas cepas de la levadura puede metabolizar D-xilitol a xilulosa-5-fosfato por xiluloquinasa (XK). Xilulosa-5-fosfato posteriormente puede entrar en la vía de las pentosas fosfato [Lachke & Jeffries 1986, Smiley & Bolen 1982] (Ver Figura 4).

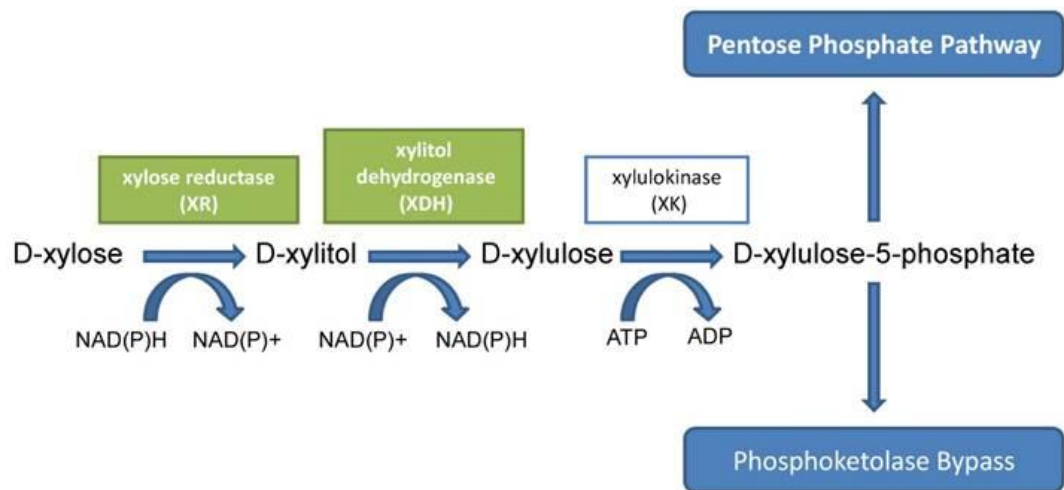


Figura 4. Ruta metabólica de la descarboxilación de la D-xilosa. (Chen, Jiang, Chen, Qin. 2010)

Con el aumento del interés en explorar más la producción de D-xilitol de una forma más ecológica y bajo métodos más económicos, la biosíntesis de D-xilitol con microorganismos se ha convertido recientemente en algo cada vez más popular. Un número considerable de bacterias, hongos y levaduras pueden producir D-xilitol. En la Tabla 1, se presenta una lista

de los diez Microorganismos productores de D-xilitol que han sido utilizados. (Xi, Zi-Hua, Sanfeng, Wensheng. 2010)

Especies	Fuentes de carbono	Crecimiento	Rendimiento	Referencias
<i>Corynebacterium</i> spp.	D-xilosa	–	69 mg / ml	Yoshitake, Co. 1971
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	D-xilosa	–	33,3 mg / ml	Ishizaki. 1973 – 1976
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	D-xilulosa, xilitol o D-manitol	Condición anaeróbica	0,7 g / g	Izumori K, Tuzaki. 1988
<i>Petromyces albertensis</i>	D-xilosa y metanol	pH inicial de 7,0	39,8 g / L	Dahiya. 1991
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	D-xilosa	condición aeróbica, 30 ~ 35 °C	77,2 g / L	Barbosa, Maria, Medeiros. 1988
<i>C. tropicalis</i> HXP2	D-xilosa	condición aeróbica, 30 °C	0,96 g / g	Chen & Co. 1981
<i>C. guilliermondii</i> Xu280	D-xilosa	condición de Micro-aeróbica	0,63 g / g	Guo & Co.2006
<i>C. maltosa</i> Xu316	D-xilosa	condición de Micro-aeróbica	0,43 g / g	Suryadi & Co. 2000
<i>Hansenula polymorpha</i>	D-xilosa y glicerol	pH de 8	0,52 g / g	Chaves-Alves & Co. 2008
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	D-xilosa	condición de Micro-aeróbica	0,54 g / g	Dahiya & Co. 1991

Tabla 2. Microorganismos productores de D-xilosa. (Chen, Jiang, Chen, Qin. 2010)

2.1.1.2 El acetato de etilo; es un líquido incoloro, con olor característico a frutas y muy inflamable. Es obtenido industrialmente por esterificación directa del ácido acético en presencia de un catalizador (usualmente ácido sulfúrico). Es comúnmente usado en esencias naturales de frutas, como solvente de nitrocelulosa, barnices y lacas, en la manufactura de piel artificial, películas y placas fotográficas, seda

artificial, perfumes y limpiadores de telas, entre otros. Su fórmula es $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, tiene un peso molecular de 88.1, punto de ebullición $77\text{ }^\circ\text{C}$ (Aya 2010).

Para la producción por vía metabólica tenemos para la producción de ésteres es el hecho de que el etanol facilita su acidificación del medio y permite la síntesis de ácidos orgánicos, en este caso, como es de esperarse, se mejora la síntesis de acetato (Votruba y Páca, 1992; Páca y Marek, 1996a). Para favorecer también la síntesis de ésteres, es necesario evitar altas concentraciones de acetaldehído mayores a 0.58 g/L , (Stanley y col., 1993 y 1997); esto puede conseguirse manteniendo una buena aireación en el medio de cultivo que permita el arrastre de este compuesto dada su elevada volatilidad, con esta acción se ve disminuida la inhibición de la síntesis de acetyl-CoA sintetasa para *Candida uflilis*, (Prokop y col., 1978).

En la Figura 5 se puede esperar que la que la concentración tanto de etanol como de acetato influyan en los equilibrios de la vía metabólica esquematizada, por lo que se considera razonable mantener el nivel de etanol adecuado para así regular la producción del éster. Es importante

también reducir la actividad de la esterasa, esto se consigue manteniendo un pH ligeramente bajo (5-6) (Kallel-Mhiri y col., 1993).

Es importante tener en cuenta el nivel de etanol en el medio de cultivo de levaduras para dirigir su transformación a la producción de distintos metabolitos. Watteeuw y col. (1979) encontraron que *Candida utilis* crece sobre etanol para producir proteína unicelular y como uno de los subproductos aparece acetato de etilo, el cual no se ve aumentado al elevar la concentración de alcohol. En el estudio de la producción de acetato de etilo por *Kluyveromyces fragilis* previamente crecida sobre lactosa como fuente de carbono para la producción de alcohol se encontró que si la concentración de este en el medio es superior a los 35 g/L da inicio la producción de acetaldehído por saturación de las vías metabólicas involucradas en la síntesis de acetato de etilo, a concentraciones menores de alcohol se obtiene un rendimiento máximo del éster (YAE/E 0.75 g/g) (Kallel-Mhiri y col., 1993). Otros estudios dieron resultados similares para otras levaduras, específicamente para *C. utilis*, si la concentración de alcohol rebasa los 50 g/L se promueve la producción de acetaldehído (Murray y col., 1988). Bol y col. (1987) también investigaron el efecto de la concentración de etanol sobre la

síntesis de acetato de etilo por *Wansenula anomala* en cultivos continuos manejando una tasa de dilución de 0.1 h^{-1} y aumentando la concentración del alcohol hasta no más de 46 g/L para mejorar los rendimientos del éster. En los estudios con *C. utilis* realizados por Christen y col. (1999) y Domenech y Col. (1999), no es tan claro el que una elevada concentración de alcohol en el medio de cultivo rinde los mejores rendimientos de acetato de etilo (0.69 y 0.76 g/g , para concentraciones de etanol de 16 y 32 g/L , respectivamente). Por otro lado, el uso de 9.9 g/L de células de *Pichia pastoris* en un reactor por lote alimentado con una disolución de etanol (4 g/L) y aireado continuamente permite la producción de acetaldehído con rendimientos de $0,15 \text{ g/g cel/h}$, alcanzando una productividad volumétrica de $1,5 \text{ g/l/h}$ de acetaldehído. Los estudios de Armstrong y col. (1984 a, 1984, b, 1988) con cultivos por lote de *Candida utilis* en soluciones diluidas de alcohol plantean que un aumento en el nivel de etanol en el medio de cultivo de 10 a 35 g/l aumenta sensiblemente la conversión del alcohol a acetato de etilo, y a concentraciones superiores se promueve la producción de acetaldehído, sin que el alcohol supere los 60 g/L . Sin embargo, Páca y Votruba (1994) sugieren que si los niveles de etanol en un cultivo por lote para *Candida utilis* llegan a los 30 g/L comienza a haber inhibición del metabolismo

celular por supresión de la respiración endógena a nivel de las enzimas del ciclo de Krebs y del ciclo del glicoxalato, (Yoshioka y Hashimoto 1984 b).

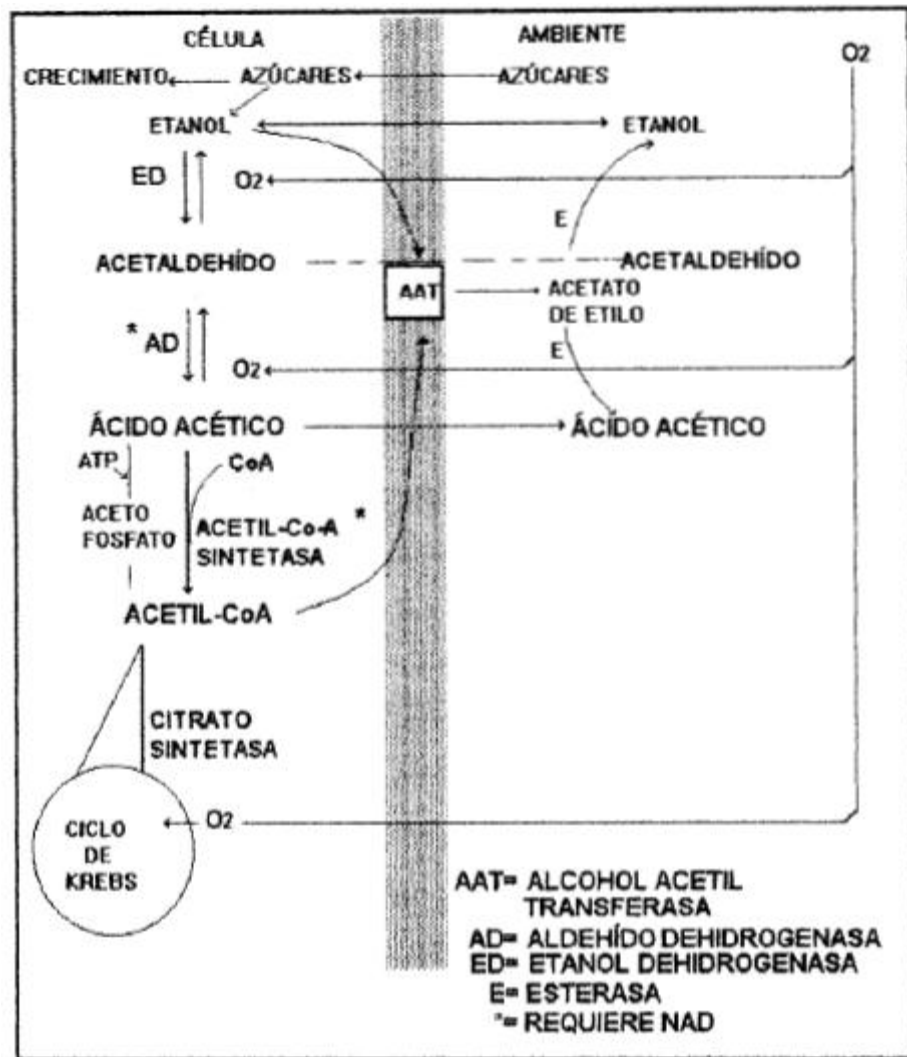


Figura 5. Modelo hipotético de las vías de consumo de etanol por levaduras. KaileLMhiri y Miclo (1993)

Kallel-Mhiri y col. (1993) realizaron estudios sobre la optimización de la producción de acetato de etilo por *Nuyvemmyces fragilis*, hallaron, después de probar concentraciones desde 2 hasta 100% de saturación,

que una concentración relativa del 40% mejora el rendimiento de acetato de etilo y disminuye el nivel de etanol en el medio. Armstrong y col. (1984 b) sugieren lo mismo; de igual manera Corzo y col. (1994) hallaron que cuando el nivel relativo de oxígeno disuelto es menor a 3% en un cultivo de *C. utilis* por lote alimentado con etanol en fase gaseosa se observan rendimientos de éster y acetaldehído, respecto al etanol, de 0.123 y 0.004, respectivamente; y a niveles de entre 5 y 15 % estos cambian a 0.19 y 0.24. Bol y col (1987) sugieren que elevadas tasas de aireación (0.2VVM) permiten dirigir el metabolismo de las levaduras a la producción de células y dióxido de carbono, reduciendo la formación de acetato de etilo. (Kuriyama & Kobayashi 1993) al estudiar el efecto del abastecimiento de oxígeno sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en una fermentación continua, notaron que si la aireación es alta y la tasa de consumo de oxígeno es de 7.79 mol/gceCh, el etanol presente en el medio se ve disminuido y se presentan otros compuestos tales como acetaldehído, ácido acético, acetoina y 2,3-butanediol. Todos estos resultados difieren de los obtenidos por Yoshioka y Hashimoto (1984 b) y los de Malcorps y com. (1991), quienes observaron una disminución en el nivel del éster por un aumento en la concentración de ácidos grasos no

saturados en las membranas celulares, debido a una buena disponibilidad de oxígeno, los cuales inhiben a la AAT.

2.1.1.3 Isobutanol; (Este líquido incoloro e inflamable con un olor dulce y a húmedo, se utiliza principalmente como disolvente. Isobutanol tiene una variedad de aplicaciones que incluyen: Materia prima en la fabricación de acetato de isobutilo, que se utiliza en la producción de barnices y similares, y en la industria alimentaria como aromatizante, como precursor de ésteres derivados; ésteres de ftalato de isobutilo como diisobutyl (DIBP) se utilizan como agentes plastificantes en plásticos, cauchos, y demás dispersiones, disolvente de pintura, removedor de barniz, aditivo de la pintura, para reducir la viscosidad, mejorar el flujo de pincel, y la formación de retardo de residuos de hidrocarburos (rubor) en las superficies pintadas, aditivo de gasolina para el carburador y así reducir la formación de hielo. Ver figura 6

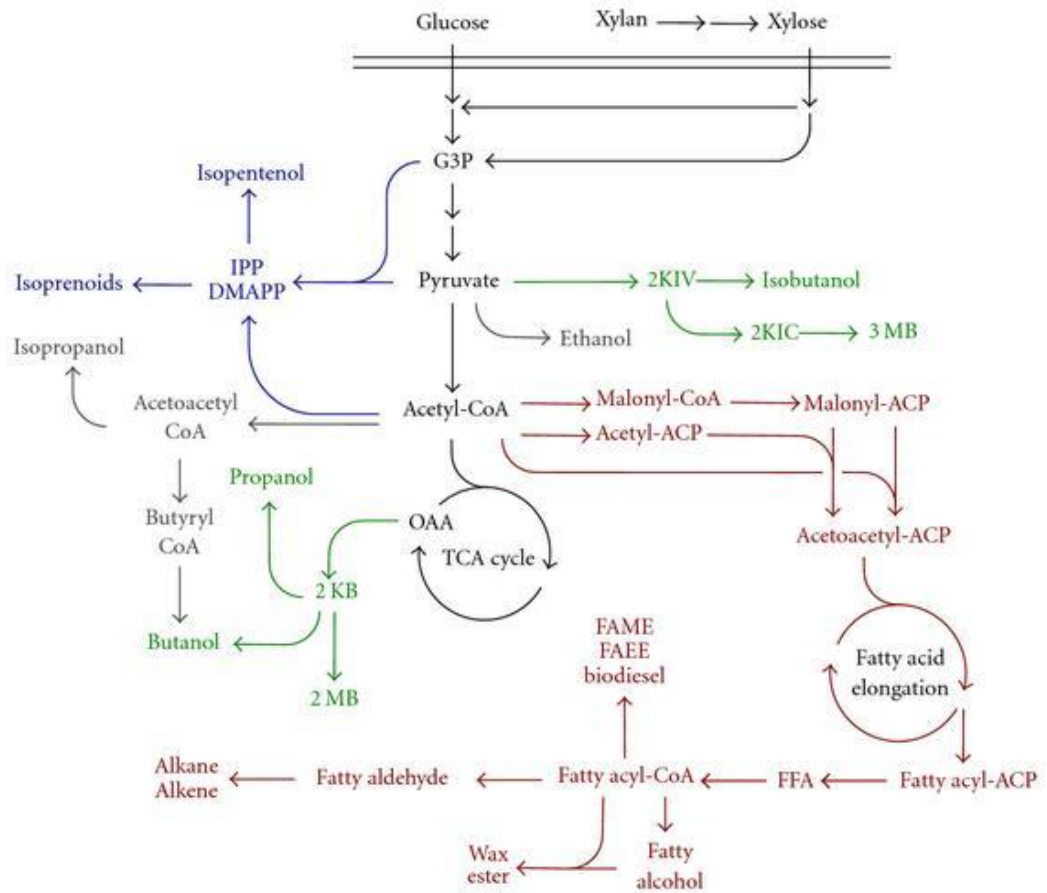


Figura 6. Esquema metabólico para la producción de biocombustibles: en la figura se muestra los procesos tradicionales de producción de biocombustibles por medio de la fermentación (ruta metabólica gris) como el etanol y el isopropanol, cadenas grandes de alcoholes no fermentables (color verde) como el isobutanol, propanol y butanol. Los combustibles isoprenoides coloreados de azul y los combustibles grasos de color rojo a partir de la ruta metabólica central. Siglas 2 KB (2-cetobutirato), 2 KIV (2-keto isovalerate), 2KIC(2-cetoisocaproato), MB 2 (2-metil-1-butanol), 3 MB (3-metil-1-butanol), ACP (proteína transportadora de acilo), CoA (coenzima A), DMAPP (difosfato dimetilalil), FAEE(éster etílico del ácido graso), FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos), ácidos grasos libres (ácidos grasos libres), G3P (gliceraldehido-3-fosfato), IPP (difosfatoisopentilo), y el OAA (oxalacetato).

2.1.1.4 Isopentanol; también conocido como alcohol isopentílico, Isobutilcarbonilo, Carbinol isobutílico, o alcohol isoamílico o alcohol

isopentílico, Isopentil alcohol, Isoamyl alcohol, 3-metil-1-butanol. Es un líquido incoloro, con sabor picante y aroma desagradable. Es soluble en alcohol y éter, ligeramente soluble en agua. Se utiliza como producto químico intermedio y solvente, en productos farmacéuticos y medicamentos. Los Isómeros de pentanol tales como 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol son una clase útil de los productos químicos con un potencial de aplicación como los biocombustibles. Se encuentran como subproductos naturales de la fermentación microbiana en sustratos a base de aminoácidos (ver fig 7). Sin embargo, su estado es limitado debido a su producción y a su rendimiento en los procesos naturales ya que estos son demasiado bajos para ser considerados en aplicaciones prácticas. A través de ingeniería metabólica, distintas cepas microbianas son estudiadas para la producción de estos. Aunque los niveles de producción actuales son aún demasiado bajos para aplicaciones industriales inmediatas, el enfoque tiene una promesa significativa para grandes avances en la eficiencia productiva. (Cann & Liao. 2009)

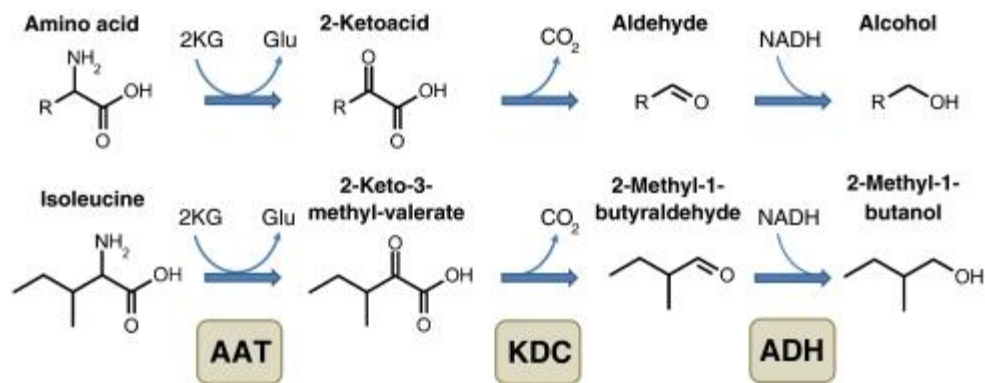


Figura 7. Ruta metabólica por la vía de Ehrlich es el camino más corto para alcoholes superiores a través de la degradación directa de los aminoácidos. Los aminoácidos primero se someten a transaminación por una enzima llamada aminotransferasa que forma 2-cetoácidos, cuya reacción es inversa mediante biosíntesis. El siguiente paso es una reacción de descarboxilación por una 2-cetoácido decarboxilasa (KDC), de los cuales el más conocido es la decarboxilasa piruvato para la producción de etanol que se encuentran en una gran variedad de levaduras y bacterias. La descarboxilación da un rendimiento de 2-cetoácido un aldehído y una molécula de CO₂ y cuya reducción final de aldehído a alcohol es a través de una alcohol deshidrogenasa (ADH), que es una reacción de fermentación estándar. Por ejemplo, isoleucina añadir a una fermentación de la levadura se puede convertir a sus 2-cetoácido, 2-ceto-3-methylvalerate (KMV), que luego pueden ser descarboxilados para formar 2-metil-1-butiraldehído, que a su vez reducido a 2-metil-1-butanol (alcohol amílico activo). Del mismo modo, la leucina se convierte en 3-metil-1-butanol, y varios otros aminoácidos también puede utilizar esta vía. . (Cann & Liao. 2009)

2.1.1.5 Alcohol amílico activo; conocido químicamente como 2-metil 1-butanol. Es un compuesto químico orgánico y se utiliza principalmente como disolvente y producto intermedio en la fabricación de otros productos químicos. Es un componente de muchas mezclas de amilo alcoholes que se venden industrialmente. Se produce de forma natural en frutas como la uva, o a través de la halogenación de pentano.

En *Escherichia coli*, la enzima que cataliza la descarboxilación KDC da un mayor a 2-cetoácidos faltantes. En combinación con ADH, estas dos enzimas es todo lo que se necesita para la conversión de 2-cetoácidos partiendo de la bacteria *E. coli* en alcoholes superiores. (Atsumi. 2008b) han demostrado que la amplia gama de soportes KDC de *Lactococcus lactis* codificada por el gen *kivd* es funcional en *E. coli* y permite la conversión de muchos 2-cetoácidos en alcoholes, incluyendo KMV de 2-metil-1-butanol y 2 - cetoisocaproato (CCI) de 3-metil-1-butanol. La síntesis de 2-metil-1-butanol es dependiente en el precursor 2-cetoácido del aminoácido isoleucina cuya ruta de biosíntesis ocurre naturalmente en las bacterias tales como *E. coli* (Fig. 6). Por lo tanto, la vía de isoleucina, hasta el precursor común KMV, es el objetivo primordial de la ingeniería de producción de 2-metil-1-butanol. (Cann & Liao. 2009).

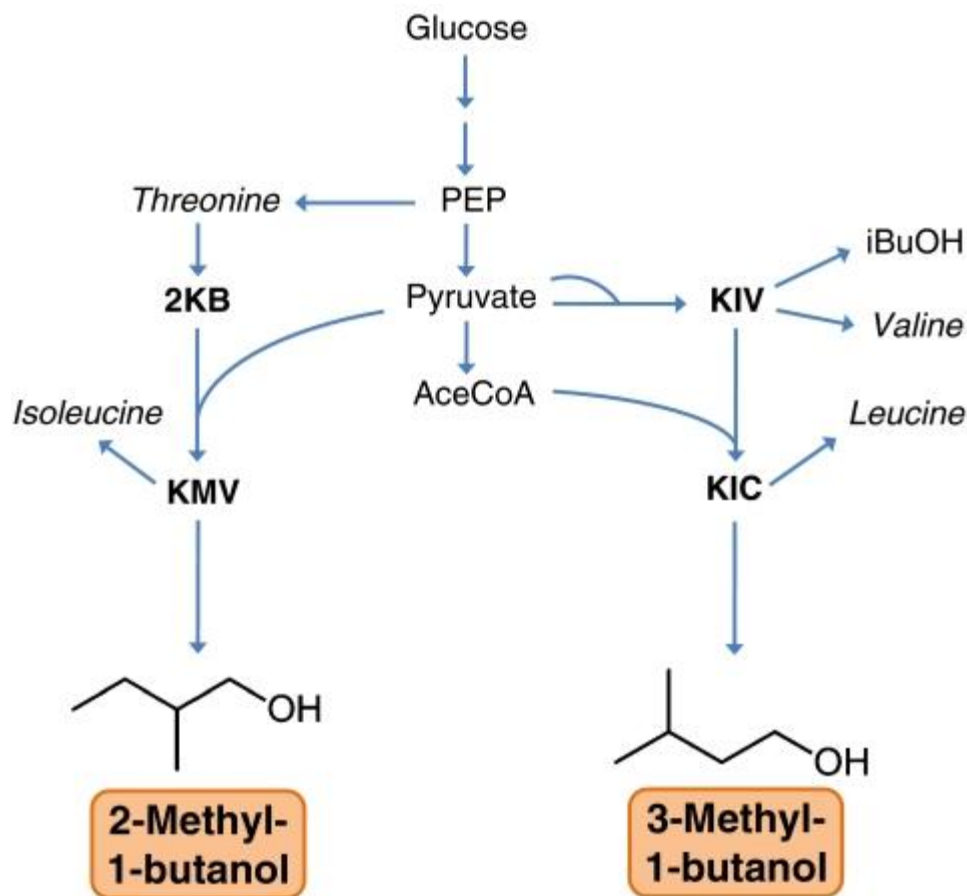


Figura 8. Producción de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol a partir de la biosíntesis de los aminoácidos de isoleucina y leucina, respectivamente. PEP fosfoenol piruvato, 2KB 2-cetobutirato, KIV 2-ketoisovalerate, KMV 2-ceto-3-methylvalerate, CCI 2-cetoisocaproato, iBuOH isobutanol. (Cann & Liao. 2009).

La primera reacción comprometida en la biosíntesis de 2-metil-1-butanol es la condensación de piruvato y 2-cetobutirato (2KB), catalizada por la enzima sintasa de aceto-hidroxiácido (AHA). Esta enzima también cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato en la primera etapa de la producción de valina, aunque la mayoría de los organismos tienen una sola isoenzima para llevar a cabo esta reacción. En las enterobacterias, sin embargo, a menudo hay tres isoenzimas presentes,

uno de los cuales es más adecuada para reaccionar con 2KB (Barak 1987;. Gollop 1990.) Y por lo tanto lo mejor para la producción de 2-metil-1-butanol . Cann y Liao (2008) confirmó que la sobreexpresión de esta isoenzima, AHAS II, es en realidad una buena opción para la producción de 2-metil-1-butanol, especialmente AHAS II de *Salmonella typhimurium*.

Para la mayoría de los microorganismos, la fuente de 2 KB para la reacción AHAS es el aminoácido treonina. Treonina se convierte en 2KB en una reacción llevada a cabo por la enzima treonina desaminasa. Varios estudios han dado ideas para aumentar la producción de treonina en *E. coli* y otros organismos (Shimizu 1995;. Lee 2007.), y gran parte de este conocimiento es transferible a la biosíntesis de 2-metil-1-butanol. En el caso de *Corynebacterium glutamicum*, se ha demostrado que una cepa productora de lisina se puede convertir en una cepa productora de isoleucina por la sobreexpresión y la eliminación de la inhibición por retroalimentación de la ruta de biosíntesis de treonina y treonina desaminasa (Morbach 1996). Trabajos recientes han validado este método para la producción de alcoholes superiores en *E. coli*, de los cuales 2-metil-1-butanol, donde la eficacia de la sobreexpresión de un

treonina desaminasa resistente y treonina operón biosintético (*thrABC*) da a la regulación de la transcripción artificial que ha sido demostrado claramente por Cann & Liao 2008 y Shen 2008 respectivamente.

Nuevas mejoras en la producción de 2-metil-1-butanol se logró a través de golpes de gracia del gen. Muchas cepas *knock-out* se cultivaron y probaron para mejorar la producción de 2-metil-1-butanol, la mayoría de los genes en las vías de la competencia y los genes que conducen a la formación de productos secundarios. Sin embargo, sólo las cepas *knock-out* que lleva a aumento en el flujo de treonina y 2 KB mejoraron significativamente (Cann y Liao, 2008). La mejor cepa testeada alcanzado 1,25 g / L de 2-metil-1-butanol con un rendimiento de 0,17 g / g de glucosa. El trabajo adicional en el diseño de la cepa debe conducir a aún más cepas de producción de 2-metil-1-butanol. (Cann y Liao, 2008).

2.1.1.5 2-fenil etanol; también llamado Alcohol 2-feniletílico Alcohol metilbencílico, es un alcohol aromático con un olor de rosas y se encuentra naturalmente en muchos aceites esenciales y en alimentos fermentados. Una producción anual de 7.000 toneladas se genera por

procesos químicos, principalmente por la reacción de Friedel-Crafts de óxido de etileno y el benceno, o mediante la hidrogenación de óxido de estireno con el níquel Raney como catalizador. También puede ser producido con métodos ecológicos a través de la vía de Ehrlich, que en un principio existe en *Saccharomyces cerevisiae*. A través de esta vía, "natural" PEA se puede obtener en alta pureza mediante un proceso banal con el medio ambiente. 2-feniletanol puede funcionar muy bien como un atrayente para moscas de la fruta y demuestra mayor atracción cuando se mezcla con otros compuestos.

Los alcoholes de *fusel* (alcoholes superiores) se derivan del catabolismo de aminoácidos a través de una ruta metabólica endógena generada por las levaduras que fue propuesto por primera vez hace un siglo por Ehrlich. (Igem 2009).

La vía de Ehrlich contiene tres pasos, transaminación, descarboxilación y reducción. El primer paso, transaminación, es principalmente catalizada por Aro8p y Aro9p, que inicialmente se caracteriza como el aminoácido aromático aminotransferasas I y II. Producción de 2-feniletanol es

principalmente catalizada por ARO9p. El segundo paso, descarboxilación, puede ser catalizada por no menos de cinco genes que muestran una similitud de secuencia con tiamina difosfato de genes dependientes de la decarboxilasa. Tres de ellos (PDC5 PDC1 y PDC6) codifican decarboxilasas piruvato, mientras que ARO10 y THI3 representan los candidatos alternativos para decarboxilasas por la vía Ehrlichia. El tercer paso, la reducción es catalizada por la deshidrogenasa para dar el producto final, 2-feniletanol. (Igem 2009). Ver figura 9.

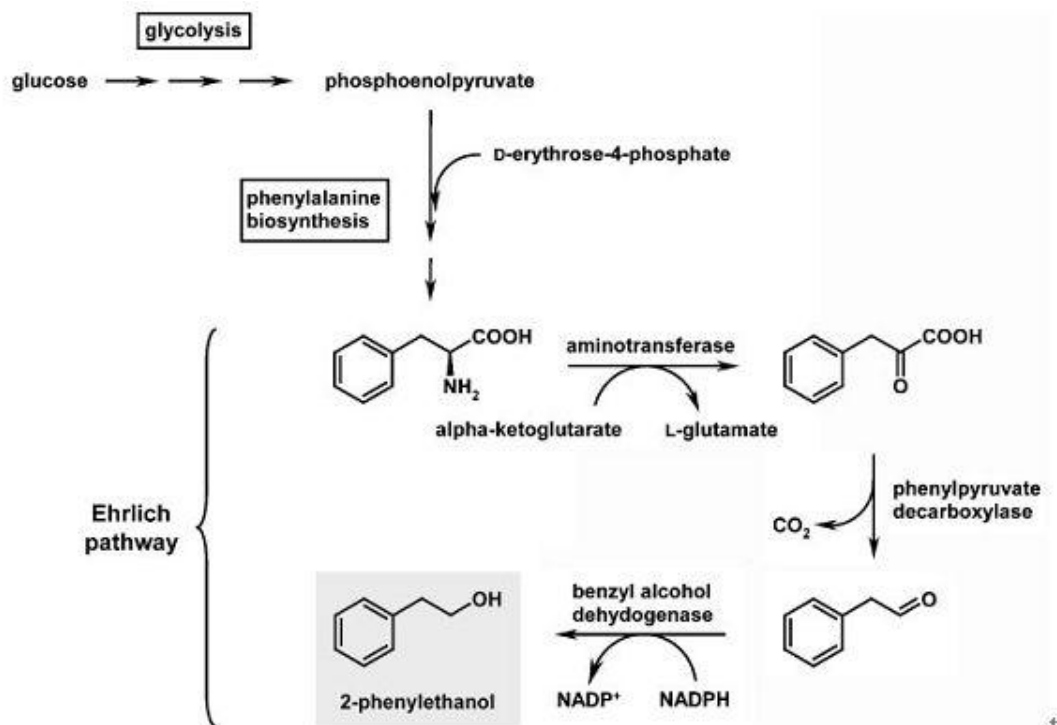


Figura 9. Ruta metabólica para la producción de 2-feniletanol por la levadura *Sacharomyces cerevisiae* (Igem 2009).

Otra posible ruta metabólica para la producción de 2-feniletanol es por la vía Shikimato (ver figura 8) en donde varios compuestos aromáticos volátiles importantes como salicilato de metilo, fenilacetaldehído, 2-feniletanol y 1-nitro-2-phenethane se derivan. Se han aislado varios de los genes responsables de la síntesis de estos compuestos volátiles importantes. Las enzimas más importantes para los derivados volátiles de fenilalanina son los aminoácidos aromáticos decarboxilasas (AADCs) quienes realizan el primer paso en el camino: la conversión de la fenilalanina en fenetilamina. Para salicilato de metilo, una metiltransferasa, *samt*, es la enzima más importante. Un factor que se ha dificultado que no se entiende bien implica la conjugación de los compuestos aromáticos volátiles en azúcares como la glucosa. Estos glucósidos ya no son volátiles y por lo tanto no pueden contribuir directamente al sabor. (Universidad de Florida Año.).

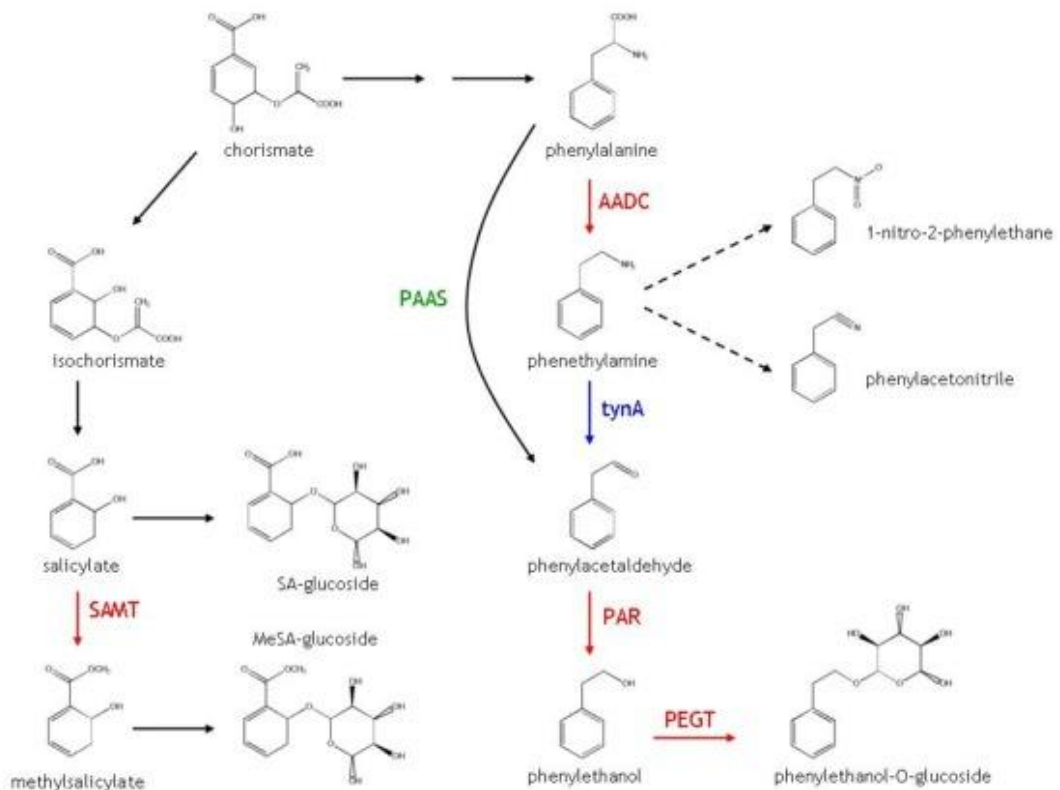


Figura 10. Ruta metabólica por la vía Shikimato para la producción de 2.feniletanol (Universidad de Florida. Año)

2.1.1.6 Ácido 2-metil butírico; tiene como sinónimo el Ácido 2-metilbutanoico, pertenece a la familia química de los ácidos carboxílicos. Es un líquido claro incoloro o ligeramente amarillo, de olor ácido picante y a queso roquefort, es usado en la fabricación de perfumes y cosméticos. El ácido 2-metilbutírico se produjo en la bacteria *lactococcus lactis* a través de hidroximetil-glutaril-coenzima A (CoA) y acetil-CoA, junto con el ATP y la oxido-reducción de los precursores. De perfiles de expresión génica y análisis de la secuencia del genoma

mostró que lactococos contenía genes redundantes para la producción de cadena ramificada de ácidos grasos que son regulados por un mecanismo desconocido vinculados con el metabolismo de carbono. Dobrowolski en el 2006 demostró la capacidad de un firmicute para inducir nuevas capacidades metabólicas en el estado no cultivable para producir energía y productos intermedios necesarios para la transcripción y traducción. Los análisis filogenéticos mostraron que homólogos de estas enzimas y sus motivos funcionales se extendieron a través de los dominios de la vida. Ver figura 11

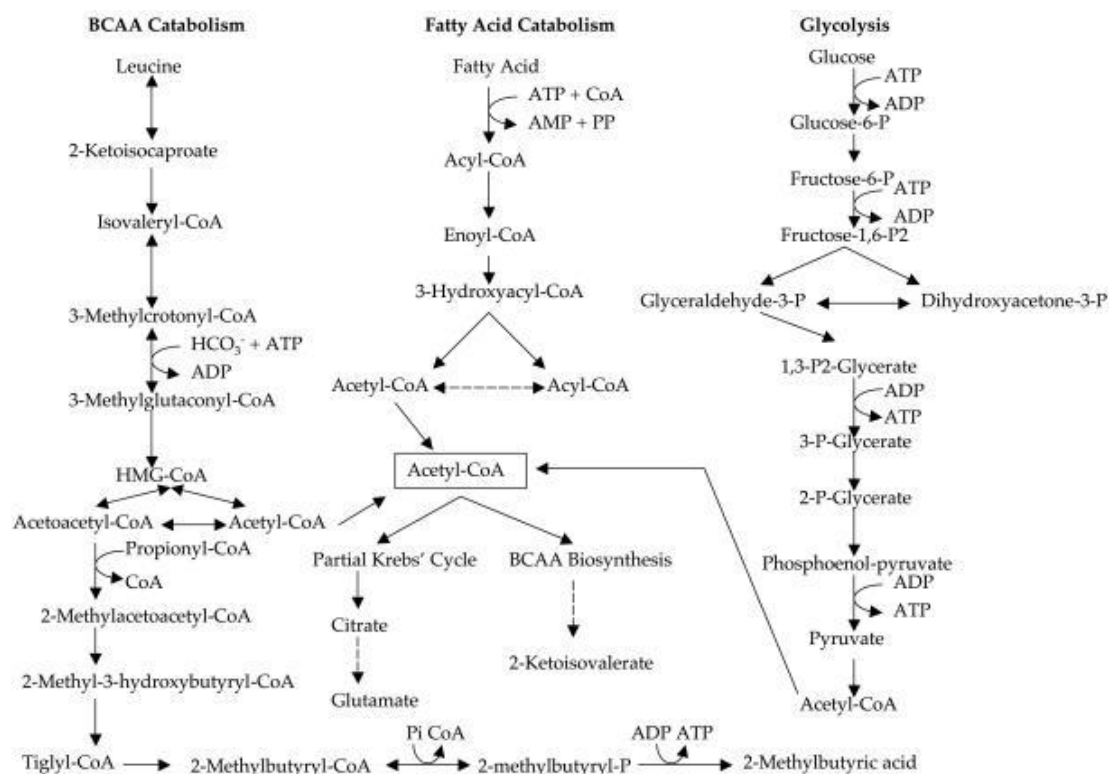


Figura 11. Producción de ácido metilbutírico a partir de la leucina por *Lactococcus lactis*

Para este ácido, La descarboxilación oxidativa de α -cetoisovalerato resultantes de la transaminación de valina, da lugar al isovalerato (ácido 2- metil butírico) sin formación transitoria de aldehído, y se ha propuesto que esta conversión está catalizada por el llamado complejo cetoácido deshidrogenasa, compuesto por tres componentes: α -cetoácido deshidrogenasa, dihidrolipoiltransacilasa y lipoamida deshidrogenasa.

2.2 CONTROL BIOLÓGICO

El término “control biológico” o “biocontrol de enfermedades” hace uso de la acción activa de uno o varios organismos excluido el hombre que de forma directa o indirecta pueden reducir o eliminar el porcentaje de un inoculo o su acción dañina que tiene sobre un determinado ser vivo.

Todo antagonista en potencia para ser eficaz contra mohos de poscosecha ha de tener pues la habilidad de colonizar y persistir con comodidad a niveles efectivos, ser compatible con otras prácticas, procesos y productos químicos de poscosecha y ser efectivo a bajas temperaturas y en algunos casos en condiciones de atmósfera controlada. Además el organismo ha de ser producible a gran escala utilizando

productos de bajo coste y conseguir una formulación adecuada. Si se cumplen todas las premisas, los microorganismos serán potencialmente comercializables, tras su registro. (Viñas, Teixidó, Abadías, Torres & Usall.)

Según Wilson y Wisiniewski (1989) los criterios que se deben de tener en cuenta para seleccionar un microorganismo como biocontrolador de enfermedades se deben tener las siguientes características:

- ✓ Estabilidad genética
- ✓ Efectividad a bajas concentraciones.
- ✓ Poca exigencia en cuanto a requerimientos nutricionales (incluido en bajas temperaturas y en almacenamiento bajo condiciones controladas).
- ✓ Gran capacidad de crecimiento
- ✓ Efectivo para un gran número de patógenos y para diversas frutas y vegetales.
- ✓ Capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos.

- ✓ Formulación estable en el tiempo.
- ✓ Facilidad de aplicación.
- ✓ No productor de metabolitos secundarios que sean tóxicos para personas y animales.
- ✓ Resistencia a los pesticidas.
- ✓ Compatibilidad con otros tratamientos químicos o físicos.
- ✓ No patogénico sobre el huésped.

Microorganismo antagonista	Hongo fitopatógeno	Enfermedad	Efectos obtenidos	Referencia
<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris en manzanas	Los sitios del hospedero colonizados por el antagonista no presentaron degradación en la pared celular (<i>in situ</i>)	El Ghaouth <i>et al.</i> , 1998
<i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i>	Pudriciones en duraznos	El antagonista tuvo efecto sólo al combinarse con atmósfera modificada (<i>in situ</i>)	Karabulut y Baykal, 2004
<i>Candida famata</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Pudriciones en naranja	Producción de fitoalexinas y control de la pudrición en un 90% (<i>in situ</i>)	Arras, 1996
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Alternaria</i> spp. y <i>Monilinia</i> spp.	Pudriciones en manzanas	Efecto de acuerdo al patógeno estudiado (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Spadaro <i>et al.</i> , 2002
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	Pudriciones en peras	Reducción de la enfermedad causada por <i>B. cinerea</i> (80%) (<i>in situ</i>)	Nunes <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) Harrison	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en mango	Reducción considerable de la severidad de la antracnosis (<i>in vitro</i> e <i>in situ</i>)	Patiño-Vera <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhodotorula minuta</i> y <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en mango	Aplicaciones precosecha de los antagonistas reducen la severidad en postcosecha (<i>in situ</i>)	Carrillo-Fasio <i>et al.</i> , 2005
<i>Verticillium lecanii</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde de los cítricos	Inducción de reacciones de defensa en el patógeno y antibiosis (<i>in vitro</i>)	Benhamou y Brodeur, 2000
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifá	<i>Botrytis cinerea</i>	Pudrición en uvas	Control parcial de la enfermedad (<i>in situ</i>)	Latorre <i>et al.</i> , 1997
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris en manzanas	Protección durante más de dos meses de la enfermedad	Batta, 2004a
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul en manzanas	Protección durante más de dos meses de la enfermedad (<i>in situ</i>)	Batta, 2004b

En la Tabla 3. Se presentan los principales microorganismos utilizados como biocontroladores, los agentes causales objetivo y los científicos que lo expusieron.

Cuadro 1. Principales estudios realizados aplicando microorganismos antagonistas en el control de hongos postcosecha <i>in vitro e in situ</i> .				
Microorganismo antagonista	Hongo fitopatógeno	Enfermedad	Efectos obtenidos	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en mango	Control de la antracnosis y de las pudriciones pediculares en mango (<i>in situ</i>)	Govender <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Penicillium expansum</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	Pudriciones en naranjas	Resultados variables dependiendo del tiempo de almacenamiento (<i>in situ</i>)	Huang <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde en limón	Inhibición del crecimiento del patógeno y control de la enfermedad en un 80% (<i>in vitro e in situ</i>)	Smilanick y Denis-Arrue, 1992
<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Debaromyces hansenii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium digitatum</i> y <i>Penicillium italicum</i>	Pudrición de los cítricos	<i>P. cepacia</i> mostró mejor efecto de biocontrol evidenciándose mediante la producción de antibióticos (<i>in vitro</i>)	Wilson y Chalutz, 1989
<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Pudriciones y mohos en uvas y manzanas	Actividad extracelular de exoquitinasa y β -1,3-glucanasa (<i>in vitro e in situ</i>)	Castoria <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhodoturla glutinis</i> y <i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Mohos azul y gris de diferentes frutos	Altos niveles de β -1,3-glucanasa (<i>in vitro e in situ</i>)	Castoria <i>et al.</i> , 1997
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris en pera	Efecto variable, en función del momento de aplicación del inóculo (<i>in situ</i>)	Zhang <i>et al.</i> , 2005
<i>Cryptococcus albidus</i> y <i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Monilia fructicola</i> , <i>Penicillium expansum</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	Pudriciones en manzanas	Altos niveles de β -1,3-glucanasa (<i>in vitro e in situ</i>)	Zhulong y Tian, 2005
<i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Candida ciferri</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul en manzanas	Reducción de la incidencia de la enfermedad (80%) (<i>in situ</i>)	Vero <i>et al.</i> , 2002
<i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Cryptococcus infirmo-miniatus</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul en manzanas	Reducción significativa de la incidencia y severidad del moho cuando se aplicó simultáneamente el antagonista y el patógeno (<i>in situ</i>)	Chand-Goyal y Spotts, 1996
<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium digitatum</i>	Pudriciones de manzanas, naranjas y limones	La combinación de la aplicación del antagonista con 0.2% de 2-deoxy-D-glucosa fue efectiva en controlar las pudriciones (<i>in vitro e in situ</i>)	El Ghaouth <i>et al.</i> , 2000

Continuación Tabla 3.

2.2.1 Agentes de biocontrol disponibles en el mercado internacional;

los productos que han sido comercializados en el mercado internacional

para el control de enfermedades en postcosecha de cítricos son: el BioSave 1000 (*Pseudomonas syringae* ESC10, Ecoscience Corp., Worcester, MA) y el Aspire (*Candida oleophila* I- 182, Ecogen Inc., Langhorne, PA). Mientras que para el control de enfermedades en postcosecha de frutas de pepita se dispone a nivel comercial del BioSave 1000 (*Pseudomonas syringae* ESC10, Ecoscience Corp., Worcester, MA), el Aspire (*Candida oleophila* I-182, Ecogen Inc., Langhorne, PA) y el YieldsPlus (*Cryptococcus albidus* Anchor Bio-Technologies) pero ninguno de ellos están registrados en Europa. Además el Aspire ha sido retirado del mercado. (Viñas, Teixidó, Abadías, Torres y Usall. AÑO)

2.3 MICROHONGOS CONTAMINANTES DE POSCOSECHA

Los microhongos o mohos han sido vistos a través de la historia como fuentes de desgracia al contaminar alimentos almacenados, lo que ha generado intoxicaciones agudas o mortales a quien se han atrevido a consumirlos. Años después se implementaron nuevas técnicas para el almacenamiento y la adecuación de los alimentos procesándolos lo que redujo significativamente la presencia y crecimiento de estos al reducir humedad y condiciones ambientales, no obstante los productos frescos

continúan siendo vulnerables a la contaminación fúngica, a continuación veremos 4 de los principales contaminantes en frutas.

2.3.1 *Alternaria* spp. Este género contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprofitos pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos como las micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados. Es necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo (Andersen *et al.* 2001).

2.3.1.1 Toxinas; las especies de *Alternaria* son capaces de producir una variedad de compuestos diferentes, algunos de los cuales son tóxicos para los mamíferos y aves (micotoxinas) y otros para las plantas (fitotoxinas) como la tentoxina un tetrapéptido cíclico (Minoletti *et al.* 2000). La producción de metabolitos secundarios (identificados o no) se

ha usado para distinguir entre especies morfológicamente similares, especialmente entre las especies de esporas pequeñas (Andersen & Thrane 1996).

2.3.1.2 Fitopatología; uno de los primeros síntomas que produce esta enfermedad es la fuerte defoliación que sufren los árboles durante la primavera, ya que las hojas y los tallos de las brotes jóvenes se necrosan casi en su totalidad. Sobre el limbo foliar aparecen áreas necrosadas de tamaño variable que producen una curvatura lateral de la hoja; estas necrosis suelen extenderse siguiendo las nerviaciones de la hoja.

Sobre los frutos recién cuajados en primavera pueden aparecer pequeñas lesiones a modo de punteado negro sobre la corteza. Estas lesiones pueden evolucionar necrosando totalmente el fruto, que finalmente cae al suelo. Las lesiones sobre la corteza de los frutos puede avanzar formando zonas deprimidas con un halo amarillento a su alrededor en las que los frutos muestran un cambio de color precoz. Posteriormente se forman unas depresiones circulares de color marrón oscuro con un tamaño que puede llegar hasta unos 10 mm de diámetro.

En el caso de un ataque severo se pueden observar lesiones en los frutos a modo de excrecencias suberosas de tamaño variable sobre la corteza. El avance de la necrosis siguiendo los nervios foliares se debe al daño celular que sufren los tejidos de la hoja por la capacidad de *A. alternata* pv. *citri* de sintetizar metabolitos tóxicos específicos.

En el estado más avanzado de la enfermedad tiene lugar la colonización micelial del hongo, dando lugar a la esporulación, diseminando la enfermedad a las hojas y frutos susceptibles adyacentes.

2.3.2 *Penicillium* spp, los penicilios son mohos comunes que desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. Su identificación en base a las características morfológicas fue caótica hasta que Pitt (1980) normalizó las condiciones de cultivo y Frisvad (1981) consideró la formación de los metabolitos secundarios en la descripción de las especies. La importancia de estos mohos en la alimentación humana y animal se debe a que, además causar deterioro, producen toxinas (Pitt & Leistner 1991).

2.3.2.1 Morfología; este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster 1986).

2.3.2.2 Micotoxinas; las especies de penicilios producen varios metabolitos secundarios, entre ellos ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, cicloclorotina, citroviridina, citrinina, griseofulvina, ocratoxina A, patulina, penitrem A (Pitt & Hocking 1997). Todas estas sustancias son originadas por los hongos para afianzarse en su ambiente natural inhibiendo a otros organismos que compiten por el substrato. Las

micotoxinas tienen diversa estructura química, su peso molecular es relativamente bajo y se difunden en el medio. Algunas existen en cantidades significativas en el ambiente natural como para influir en la salud del hombre y otros animales, pero es prácticamente imposible inactivarlas por los tratamientos térmicos que se aplican corrientemente en la elaboración y conservación de los alimentos (Samarajeewa 1991).

2.3.3. *Aspergillus spp*; los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticio. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Kozakiewicz 1989).

2.3.3.1 Micotoxinas, son varios los metabolitos secundarios de los aspergilos que son considerados micotoxinas: aflatoxinas,

esterigmatocistina y otros , algunos de los cuales también son producidos por especies de penicilios, por ejemplo ácido ciclopiazónico y ocratoxinas (Smith & Ross 1991).

Es común que las condiciones óptimas para el crecimiento de las especies toxinógenas no coincidan con las que facilitan la producción de micotoxinas. Así, mientras el desarrollo óptimo de *A. flavus* ocurre a 36°C con una actividad del agua de 0,95, la producción de aflatoxinas es favorecida por una temperatura de 33°C a una actividad de 0,99, aunque pueda ser formada aún a 15°C con una actividad del agua de 0,95. Por otra parte, con una actividad del agua óptima *A. versicolor* produce la mayor cantidad de esterigmatocistina a pH 5,6 (Moss 1991).

2.3.4 *Botrytis spp* el patógeno *Botrytis spp.* produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se semejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos,

duros y de color negro. Algunas especies producen a veces una fase perfecta de Sclerotinia, en la que las ascosporas se forman en un apotecio. (Palomo. 2009).

2.3.4.1 fitopatología; el patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10° C. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero lo hacen en tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores senescentes, follaje moribundo de las plantas, escamas de bulbos muertos, entre otros. Cuando los días son cortos, la luminosidad escasa y las temperaturas son del orden de 15-20° C, las plantas pueden sufrir graves daños. *Botrytis cinerea* precisa de bases nutritivas formadas por hojas senescentes, flores no fecundadas, heridas o muñones de hojas resultantes de las podas, es decir materia orgánica muerta, para poder iniciar la invasión de las partes vivas de la planta. (Infoagro.1997)

Un síntoma particularmente sorprendente en los frutos es el denominado "mancha fantasma". En realidad, se trata de ataques de *Botrytis* abortados. Alrededor de un punto central muy pequeño y necrótico se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino sobre el fruto verde y amarillo en el fruto maduro. La calidad gustativa del fruto no sufre, pero si la presentación. (Infoagro.1997)

2.3.4. *Rhizopus spp.*, es un género de mohos que incluyen especies cosmopolitas de hongos filamentosos hallados en el suelo, degradando frutos y vegetales, heces animales, y residuos. Las especies de *Rhizopus* producen esporos asexuales y sexuales. Los esporangiosporos asexuales se producen dentro de una estructura aguzada, el esporangium, y son genéticamente idénticos a su padre. En *Rhizopus*, el esporangio es soportado por una gran columela apofisada, y el esporangióforo asoma entre rizpodes distintivos. Cigosporos negros se producen después de dos fusiones compatibles de micelios durante la reproducción sexual. Y hacen colonias que pueden ser genéticamente diferentes de sus padres.

Algunas especies de *Rhizopus* son agentes oportunistas de cigomicosis humana. Pueden causar serias (y con frecuencia fatales) infecciones en humanos y en animales debido a su rápido crecimiento a relativamente altas temperaturas. Algunas especies son patógenos vegetales. Dos son usados en fermentación: *Rhizopus oligosporus*, en la producción de tempeh, un alimento fermentado derivado de grano de soja; *R. oryzae* se usa en la producción de bebidas alcohólicas, en partes de Asia y de África.

2.3.4.1 Fitopatología; en tomates la pudrición de *Rhizopus* spp se presenta con formaciones llenas de agua y pueden exudar un líquido claro. La superficie de la lesión puede estar cubierta con una capa delgada de estructuras fúngicas parecida a algodón (especialmente bajo condiciones de humedad). Los tejidos dentro de la lesión son frecuentemente mantenidos juntos en relación al grueso de los filamentos fúngicos de micelios. La esporulación oscura puede coronar con un ramillete blanco de *Rhizopus* spp. El micelio puede infectar al fruto adyacente a través de sus aberturas naturales o magulladuras mecánicas, dando lugar a un anidado de mohos y a un fruto descompuesto. Las esporas son extremadamente pequeñas y ligeras que pueden ser

transportadas por las corrientes de aire para infestar nuevos frutos, pudiendo ser lejos de la fuente de contaminación. Bajo condiciones favorables, se ha observado que el *Rhizopus* spp puede crecer a cortas distancias sobre superficies secas, tales como palets y cajas de cartón corrugado, y puede sobrevivir por meses en residuos de frutos dejados en contenedores de recojo y del campo.

2.4 BIORREACTORES

Los biorreactores son recipientes o sistemas que mantiene un ambiente biológicamente activo y comprende el área de la biotecnología. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Los biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son usualmente fabricados en acero inoxidable para mayor durabilidad (Koshkin, Shirkévich 1975).

Un biorreactor puede ser también un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular como fue el caso del crecimiento estructurado de células de cartílago humanas que formaron una oreja partiendo de un polímero biodegradable (Yilin Cao 1995).

Un biorreactor busca mantener ciertas condiciones ambientales y nutricionales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, catalizadores, entre otras) para un organismo o sustancia bioquímica. En función de los flujos de entrada y salida, la operación de un biorreactor puede ser de tres modos distintos:

1. Lote (Batch)
2. Lote alimentado (Fed-Batch)
3. Continuo o quimiostato

2.4.1 Oxígeno, el oxígeno disuelto (OD) en un cultivo microbiano es un sustrato importante en las fermentaciones aerobias y puede ser limitante si no es bien mezclado en el medio, más cuando su uso es para la producción y sostenimientos de elevadas concentraciones celulares de la

cepa *Candida guilliermondii* aislada de la Pontificia Universidad Javeriana, por tanto la velocidad en su consumo puede exceder la velocidad de abastecimiento ocasionando limitaciones de oxígeno. La concentración crítica de oxígeno disuelto (cuando la tasa de crecimiento específica depende de la concentración relativa del gas) para los cultivos de levadura varía de 5 a 10% de saturación (Shuler y Kargi, 1992). La aireación provee a los cultivos de oxígeno, el cual se requiere para el crecimiento celular aún en condiciones de fermentación, es indispensable para la síntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol que constituyen las membranas celulares.

El oxígeno también se emplea en la respiración y producción de ATP e incrementa la masa celular (Kuriyama y Kobayashi, 1993). La síntesis de acetato de etilo por diferentes cepas de levadura tales como *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S.uvarum*, se afecta fuertemente por el nivel de oxígeno en el medio de cultivo (Armstrong y col., 1984b).

2.4.2 Azúcares, los azúcares probados habitualmente en fermentación son la glucosa, la galactosa, la sacarosa, la maltosa, la lactosa y la

rafinosa. Puede igualmente ensayarse con otros carbohidratos como la trehalosa, la melobiosa y polisacáridos como el almidón y la inulina (Gancedo & Serrano 1989).

2.5 FILOSFERA

La filosfera se refiere a la microbiota nativa sobre las superficies de las plantas en su región aérea, por tratarse de un área totalmente expuesta al medio ambiente los cambios de temperatura extremos, humedad relativa cambiante, a su humedad superficial y la radiación ultravioleta que afecta considerablemente el crecimiento microbiano, la cepa nativa aislada por la PUJ a partir del tomate HIB contiene todas las medidas necesarias para poder ser adaptable a este tipo de cambios abruptos y extremos para muchos microorganismos.

La biodiversidad de las levaduras en los maizales en Illinois se que encontró que la mayoría de los aislamientos correspondían a *Candida guilliermondii* (55%), *Candida zeylanoides* (24%), *Candida shehatae* (11%) y *Debaryomyces hansenii* (3%), (Nout y co. 1997)

2.5.1 Radiación ultravioleta; el flujo diario de la radiación solar, la cual incluye la radiación visible, la infrarroja y la ultravioleta, esta última tiene de 200 a 400 nm el valor más alto de energía quantum (longitud de onda corta) el cual es perjudicial al romper las cadenas de pirimidinas del ADN. Aun así se han encontrado dos tipos de metabolitos secundarios, los carotenos y las micosporinas, que podrían estar vinculados a mecanismos de fotoprotección. Las levaduras nativas podrían convertirse de tal modo en fuente natural de estos compuestos que se acumulan como respuesta a la exposición a los rayos UV-B, de esta manera adquirir enorme valor para las industrias de alimentos, fármacos y cosméticos.

La radiación induce mucosidad en las colonias de levaduras nativas debido a un aumento en la síntesis y acumulación de exopolisacáridos, que son hidratos de carbono complejos que se excretan y acumulan por fuera de las células y dan al cultivo un aspecto mucoso. En cianobacterias se ha verificado el mismo efecto y se ha postulado que esta respuesta también podría ser un mecanismo de fotoprotección. (Libkind y Moliné, 2005).

2.6 ATMÓSFERAS CONTROLADAS

La atmósfera controlada es una técnica frigorífica de conservación en la que se interviene modificando la composición gaseosa de la atmósfera en una cámara en frigoconservación, en la que se realiza un control de regulación de las variables físicas del ambiente (temperatura, humedad y circulación del aire). Se entiende como atmósfera controlada (AC) la conservación de un producto hortofrutícola, generalmente, en una atmósfera empobrecida en oxígeno (O₂) y enriquecida en carbónico (CO₂). En este caso, la composición del aire se ajusta de forma precisa a los requerimientos del producto envasado, manteniéndose constante durante todo el proceso. (Infoagro 2011)

La Atmósfera Controlada permite preservar ciertas frutas y verduras (manzanas, peras y kiwis en particular) dos a tres veces más tiempo que la conservación en frío normal, y permite así una mayor flexibilidad en su comercialización, así como una calidad mejorada (Absoger- empresa).

Esta técnica asociada al frío, acentúa el efecto de la refrigeración sobre la actividad vital de los tejidos, evitando ciertos problemas fisiológicos y disminuir las pérdidas por podredumbres. La acción de la atmósfera sobre la respiración del fruto es mucho más importante que la acción de las bajas temperaturas. Esta atmósfera controlada ralentiza las reacciones bioquímicas provocando una mayor lentitud en la respiración, retrasando la maduración, estando el fruto en condiciones latentes, con la posibilidad de una reactivación vegetativa una vez puesto el fruto en aire atmosférico normal. (Infoagro. 2011)

2.6.1 Ventajas e inconvenientes de la atmósfera controlada

a) Ventajas:

- Prolongación del periodo óptimo de la conservación entre un 40 y 60 %, respecto de la conservación en atmósfera normal.
- Reducción de alteraciones y podredumbres típicas del frío, de la conservación frigorífica a 0° C, ya que permite elevar temperaturas.
- Reducción de las mermas por peso.
- Reducción de fisiopatías.

- Mayor resistencia del producto después de la conservación en cuanto al reinicio del metabolismo.
- Permite el empleo de temperaturas elevadas, necesitando menos frigorías respecto al frío Normal.
- Efecto fungicida debido a la elevada concentración de CO₂.
- Se reduce el calor de respiración del fruto como consecuencia de la mínima intensidad respiratoria debido al bajo contenido en O₂ y la elevada concentración de CO₂.

b) Inconvenientes:

- Inversión inicial elevada.
- Mantener la adecuada composición de la atmósfera.
- Necesidad de un instrumental tecnológico elevado para su control.
- Limitaciones de apertura de la cámara.
- Aumento de la problemática de incompatibilidades entre variedades a consecuencia de las diferentes condiciones de conservación.
- Nuevas fisiopatías y desórdenes propios de la AC.

2.6.2 envasado en atmósfera controlada (EAC)

La tecnología de EAC deriva de la tecnología de atmósfera controlada (AC) utilizada para ampliar la vida útil de las frutas y verduras almacenadas a granel. Estos almacenes herméticos están equipados con sistemas que controlan escrupulosamente la composición de la atmósfera gaseosa en el interior.

Con el envasado en atmósfera controlada (EAC), el empleo de películas para envasar selectivamente permeables en asociación con una composición conocida del gas introducido en el envase proporciona una atmósfera interna con la composición deseada durante la vida útil del producto. En el envase cerrado descenderá el nivel de oxígeno y aumentará el nivel de CO₂, debido a los efectos de la respiración natural del vegetal crudo. Si el envase fuese totalmente impermeable, se alteraría el producto con bastante rapidez como resultado de la glucólisis anaerobio con bajas presiones de oxígeno.

El empleo de una película semipermeable idónea permite la entrada de oxígeno en una cuantía controlada para sustituir el oxígeno captado por el producto fresco. Cuanto menor sea la permeabilidad de la película, menor será el nivel final de oxígeno. La estabilidad se alcanzará a una determinada temperatura cuando la captación de oxígeno por el producto sea la misma que la reposición desde la atmósfera exterior. El valor de la presión estable del oxígeno depende de las variables tales como el producto, la película, la temperatura y la composición gaseosa de las atmósferas interna y externa.

2.6.3 Envasado en atmósfera modificada (EAM)

El envasado en atmósfera modificada (EAM) para ampliar la vida útil de productos vegetales sometidos a tratamiento térmico marginal es una técnica algo más moderna que la aplicación del EAC de productos crudos preparados. La técnica se basa en el empleo de nitrógeno sólo o mezclado con dióxido de carbono, y en la reducción del contenido en oxígeno hasta niveles normalmente inferiores al 1%.

La atmósfera modificada se consigue realizando vacío y posterior reinyección de la mezcla adecuada de gases, de tal manera que la atmósfera que se consigue en el envase va variando con el paso del tiempo en función de las necesidades y respuesta del producto.

En la técnica del envasado en atmósfera modificada se deben tener en cuenta cuatro componentes básicos: el envase empleado, la mezcla de gases, los materiales de envase y los equipos de envasado; todos ellos condicionados a su vez por la naturaleza del producto a envasar.

La composición normal del aire utilizado en el EAM es de 21% de oxígeno, 78 % de nitrógeno y menos del 0,1 % de dióxido de carbono. El CO_2 es un gas altamente soluble en agua y con propiedades bacterioestáticas y fungiestáticas, lo que retarda el crecimiento de hongos y bacterias aeróbicas. El CO_2 actúa alargando la fase vegetativa del crecimiento microbiano. El dióxido de carbono no es totalmente inerte y puede influir sobre el color, la consistencia y otros atributos de la calidad de las hortalizas.

Las concentraciones de CO₂ han de estar comprendidas entre el 20 y 60%, siendo más efectiva su acción a bajas temperaturas. En el envasado en atmósfera modificada se procura reducir al máximo el contenido en oxígeno para disminuir el deterioro de los productos por oxidación. El nitrógeno se caracteriza por ser un gas inerte. La utilización del N₂ evita el colapso de los envases en aquellos casos en los que el producto absorbe CO₂.

Los factores que afectan a la intensidad de estos procesos y las condiciones de manipulación y comercialización, deben ser tenidos en cuenta para diseñar las características del sistema: producto-envase-entorno. Por ello, para efectuar el envasado en atmósfera modificada, debe seleccionarse una película polimérica con características de permeabilidad adecuadas.

El empleo de películas de diferente permeabilidad dará lugar a la formación de atmósfera de equilibrio distinto y por tanto la evolución de los frutos también será diferente. La envoltura individual de los frutos con una película retráctil conforma una segunda lámina externa de

protección y una microatmósfera alrededor del fruto. Esta barrera evita la pérdida de humedad, protege frente a la propagación de podredumbres y mejor las condiciones higiénicas en la manipulación.

2.6.4 El envasado mediante películas plásticas; el material de envasado elegido debe ser capaz de mantener constante la mezcla de gases, impidiendo la entrada de oxígeno y la fuga de dióxido de carbono. Además es importante que posea las características de antivaho y de pelabilidad. Con la cualidad del antivaho evitamos que las gotas de agua procedentes del vapor de agua se condensen en la superficie interna del envase. La soldadura de los envases además de ser resistentes e impermeables, deben facilitar la apertura de la bolsa.

A continuación se van a describir de forma resumida los distintos tipos de películas plásticas que se emplean actualmente en el envasado de frutas y hortalizas frescas.

2.7 LA NARANJA

La naranja tiene bajo valor energético, pues su componente mayoritario es el agua. En cuanto al aporte de vitaminas, cabe destacar su contenido de vitamina C y ácido fólico. Igualmente contiene cantidades apreciables de flavonoides (sustancias biológicas naturales con potencial para reducir el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares) y betacaroteno, el cual le da su color anaranjado y posee propiedades antioxidantes. Este último nutriente se transforma en vitamina A conforme el cuerpo lo necesita, y es esencial para la visión, el buen estado de piel, cabello, huesos, mucosas y el buen funcionamiento del sistema inmune, que nos protege contra enfermedades.

2.7.1 Clasificación taxonómica

Familia: Rutáceas.

Género: Citrus.

Especie: Citrus sinensis

Variedad: Tangelo

2.7.2 La naranja y su salud

Por sus propiedades nutritivas y su bajo costo, son muy consumidas y recomendadas para todos en general. Debido a su contenido de vitamina C, betacaroteno y flavonoides, son ideales para aquellos que padecen de enfermedades del corazón y para quienes quieren prevenirlas. Estas sustancias, al prevenir riesgos asociados a los padecimientos mencionados, actúan como antioxidantes y a la vez impiden la aterosclerosis o depósito del colesterol malo en las paredes de las arterias. Por su contenido de vitamina C, es ideal para aquellas personas con necesidades aumentadas y/o deficiencias de esta vitamina, como los deportistas, fumadores, los adultos mayores (ya que consumen pocas frutas y vegetales), personas con las defensas bajas y con enfermedades inflamatorias crónicas. Por esa misma razón, se recomienda para la prevención de infecciones o resfríos, ya que mejora el sistema inmune. Es igualmente importante para aquellos con anemia por deficiencia de hierro, pues al consumirla junto con alimentos fuente del mismo (carnes, frijoles, entre otros), aumenta la absorción del mineral deficiente en nuestro organismo.

El aporte de ácido fólico hace a la naranja recomendable para las mujeres embarazadas, siempre y cuando no le provoque acidez o algún trastorno semejante.

El zumo o jugo de esta fruta posee acción colagoga y colerética, es decir, acción depurativa o purgante y que provoca el vaciamiento de la vesícula biliar. Este vaciamiento, que se produce normalmente cuando comemos para ayudar a la digestión de las grasas, puede resultar brusco si se consume el jugo en ayunas. Estas acciones a su vez pueden causar molestias como náuseas o dolor abdominal, por lo que está desaconsejado para la persona con cálculos biliares (colelitiasis).

La fibra aportada por la naranja ayuda a prevenir o mejorar el estreñimiento y ejerce un efecto saciante o de “llenura”, lo cual puede favorecer a las personas con exceso de peso y diabetes incluso.

Se recomienda mucho a deportistas, pues su combinación de vitaminas y minerales, es ideal para reponer los líquidos perdidos por la sudoración y para minimizar el riesgo de lesiones musculares. Como si fuera poco, la naranja posee un efecto diurético, que beneficia a aquellos con

hiperuricemia (ácido úrico elevado) o gota y en caso de cálculos renales (si no son por oxalato de calcio), ya que favorece la eliminación de ácido úrico y sus sales. Asimismo, es ideal para la hipertensión arterial y otras enfermedades relacionadas con retención de líquidos.

Quienes sí deben vigilar y controlar su consumo son aquellos que padecen insuficiencia renal (por su contenido de potasio), quienes por alguna otra causa también llevan una dieta baja en el mineral, si se tienen cálculos renales por oxalato de calcio (por su contenido de ácido oxálico) y quienes sufren molestias al consumirlas por la presencia de trastornos gástricos como hernia hiatal, acidez, gastritis, úlcera gástrica o gastroduodenal.

2.7.3 El mercado nacional; (fuente Corporación Colombia Internacional . 2000) la naranja que se produce en Colombia – variedades común y Valencia– se destina hoy exclusivamente al mercado en fresco. Aunque la vocación de la naranja Valencia es servir como materia prima para la industria, la que se produce en el país no cumple con los requisitos exigidos para el procesamiento industrial ni en calidad ni en precio. La naranja que compran los consumidores colombianos se

utiliza para exprimir y obtener jugo. No existe evidencia clara en el país sobre un consumo directo de la fruta fresca a escala masiva. Además, parece existir un relativo desabastecimiento en el mercado en fresco que se refleja en un precio que supera en dos y hasta tres veces el precio que podría pagar la industria para competir con los concentrados de jugo de naranja que actualmente se importan; a lo anterior se suman las restricciones de escala en la producción que enfrenta la industria nacional. La producción nacional destinada al mercado en fresco, aunque hoy no parece muy amenazada, sí podría estarlo hacia el mediano plazo, cuando los consumidores nacionales empiecen a sustituir la naranja fresca para exprimir por concentrados y jugos importados que tienen precios más bajos que los productos nacionales. El producto nacional también podría verse amenazado, en el mediano plazo, por la entrada de producto fresco de otros países.

Debe anotarse que la relación entre el Índice de Precios al Productor –IPP– y el Índice de Precios al Consumidor –IPC– muestra que el primero supera sistemáticamente al segundo durante los últimos años, lo

que evidencia tasas de rentabilidad aceptables para el productor nacional y reducciones en los márgenes de comercialización derivados de la modernización en los sistemas de comercio y de la relación directa entre productores y supermercados, que se ha venido generalizando durante los últimos años.

Una vez cosechada, la naranja se transporta y almacena en canastillas plásticas de 50x30x35 cm con capacidad de 20 kg, cuyo contenido debe ser homogéneo, con frutos lavados y encerados, del mismo origen, variedad, categoría, color y calibre, atractivos al consumidor. Sin embargo, es habitual entre los citricultores tradicionales empacarla en costales o venderla en plazas minoristas y fruterías sin clasificar. En particular, el mercado de Medellín prefiere la naranja empacada en malla plástica, lo que permite fraccionar el producto y marcar su peso y precio para agilizar las operaciones de registro de la compra; este empaque, sin embargo, no protege la fruta de los roces y golpes a los que está expuesta durante el transporte y la exhibición.

En el mercado de Bogotá los consumidores prefieren la naranja sin empacar, exhibida a granel. El empaque recomendado para un óptimo

manejo postcosecha es la caja de cartón, con paneles que separen cada fruta, pero esta alternativa no se ha generalizado todavía porque se considera costosa.

2.7.4 Cosecha; el momento de la recolección es, sin lugar a dudas, uno de los puntos clave en la lucha contra las enfermedades. Ésta debe realizarse con extremada precaución, evitando al máximo la producción de golpes y heridas y, por consiguiente, de vías de entrada del patógeno. Además, se deben descartar los frutos ya afectados por podredumbres, los que han caído en el suelo y han podido contaminarse con esporas, los que presentan heridas en la piel, etc., o bien separarlos del resto para ser tratados adecuadamente a sus condiciones. Asimismo, los envases de campo deben mantenerse libres de tierra y de restos vegetales que podrían provocar contaminaciones en el “drencher”. (Viñas, Teixidó, Abadías, Torres & Usall).

4. JUSTIFICACIÓN

En las revisiones antiguas, se ha encontrado a *C. guilliermondii* como una levadura antagonista, que produce diversos metabolitos secundarios, como el acetato de etilo que puede incidir en la deshidratación de alimentos, así como en muchos otros usos a nivel industrial.

Grandes volúmenes de alimento vegetal se pierden por la acción microbiana sea por su putrefacción de la misma o por la generación de toxinas que restringen su uso como alimento humano. Para controlar las enfermedades de post-cosecha mediante la utilización de microorganismos antagónicos existen dos posibles vías. Podemos estimular y manejar antagonistas que ya existen sobre la superficie del fruto o bien podemos introducir artificialmente antagonistas contra los patógenos. Se ha demostrado que existen antagonistas naturales en la filósfera y rizósfera de plantas que pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad. También se ha sugerido que ciertas poblaciones microbianas existentes sobre la superficie de plantas, pueden estar en realidad bajo el control genético de la planta. (Viñas,Teixidó, Abadías, Torres & Usall.)

El sistema de control más para el control de frutas y verduras frescas más extendido es el empleo de productos químicos para este caso el empleo de fungicidas, pero actualmente cada vez son mayores las objeciones de carácter higiénico sanitarias por su potencial cancerígeno, teratogénico o mutagénico (Martínez 2001). Debido al riesgo de desarrollar problemas crónicos para el ser humano el consumo de alimentos contaminados es cada vez más necesario desarrollar nuevos y efectivos métodos de control de las enfermedades de poscosecha que sean aceptados por el consumidor y que no supongan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. La reducción del inoculo fúngico que el agricultor pueda hacerle a través de una buena limpieza y desinfección, las técnicas de conservación y manejo que minimicen el daño a la fruta junto con la utilización de condiciones de almacenamiento óptimas para mantener la resistencia del huésped y el uso de alternativas a los fungicidas de síntesis, por sí solos o de forma integrada, pueden resolver de forma muy satisfactoria las pérdidas a causa de las enfermedades fúngicas en poscosecha de frutas (Viñas, Teixidó, abadías, Torres AÑO).

En esta revisión, se explicara de forma clara y precisa, las rutas metabólicas por los cuales *C. guilliermondii* elabora subproductos y sus utilidades, para que en un futuro se utilice esta información como estrategia de investigación en proyectos relacionados con microbiología agrícola.

5. OBJETIVOS

ANALIZAR EL ESTADO DEL ARTE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR PARTE DE *C. GUILLIERMONDII*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir la lista de palabras clave a cerca de los metabolitos secundarios de *C. guilliermondii*

En el documento final, señalar las rutas metabólicas seguidas por *C. guilliermondii* para generar sus subproductos.

Desarrollar protocolos para el uso de *C. Guilliermodii* como biocontrolador en la podredumbre causada por microhongos en la naranja var. Tangelo.

Conocer el crecimiento óptimo de la levadura en estudio en diferentes temperaturas, pH y porcentajes de sacarosa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema de conservación de la cepa que dispone el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana es almacenada sobre un sustrato orgánico de uchuva ya que es un medio natural que le proporciona los nutrientes necesarios para poder reproducirs, también se ha liofilizado como alternativa para su conservación a largo plazo (Martínez. 2010), para la ejecución posterior de esta tesis se recomienda pedir la levadura por triplicado en caja de petri con agar malta y se conservarán refrigerado por tres meses tiempo después se repetirá el mismo pedido de ahí se partirán todos los repiques para las posteriores pruebas.

5.1 MATERIAL VEGETAL

Se propone utilizar como evaluador del poder antagónico de la levadura el uso de la fruta de naranja tangelo como su lugar de cultivo para adicionarlo en pre-cosecha, las cuales deben estar limpias libre de magulladuras, manchas y cortes, con una buena compactación del producto.

5.2 MATERIAL CELULAR

Se utiliza la cepa de la Pontificia Universidad Javeriana *Candida guilliermondii* para evaluar su poder antagónico como conservante o limitantes de la podredumbre en frutas y verduras y una cepa de *Penicillium* spp. como prutrefactor de la fruta.

5.3 MATERIAL QUÍMICO

Se propone la adición en conjunto de sustancias químicas inocuas para el ser humano como lo es el bicarbonato de sodio que posee un efecto inhibitorio sobre muchos microhongos contaminantes (Soto y Martínez 2009)

5.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO ÓPTIMO

Como su poder antagónico de la cepa a evaluar se hará por la célula en vivo sobre el producto, se hace necesario realizar el primer estudio se para conocer su crecimiento óptimo como mecanismo para su multiplicación celular, las fermentaciones se propagan con la cepa de

levadura en estudio y con una concentración y volumen previamente definido por el ejecutor, en un medio líquido con 20g/l de glucosa y 20g/l de extracto de malta como segunda fuente de carbono el cual será nuestro medio de cultivo estándar incubándose durante 36 horas como también es necesario probar formas de manipulación del cultivo evaluándolos con por lote y por lote alimentado. Se hace énfasis que para su utilización en procesos industriales el uso de subproductos agroindustriales como melaza de caña de azúcar deberán ser tenidas en cuenta por su abundancia y economía.

1. Temperatura

- a. Incubación a temperatura constante de $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- b. Incubación a temperatura constante de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- c. Incubación a temperatura constante de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$

2. Concentración de Etanol

- a. 5%
- b. 25%
- c. 50%

3. Concentración de Bicarbonato de sodio

- a. Concentración de BCS al 0%
- b. Concentración de BCS al 2%
- c. Concentración de BCS al 4%

5.4.1 Evaluación del crecimiento óptimo; su diagnóstico se corroborará mediante el recuento en cámara Neubauer que se procederá

de la siguiente forma y tomando como dilución 10^{-1} sobre agua destilada y con la adición del colorante azul de metileno. Ver figura 4.

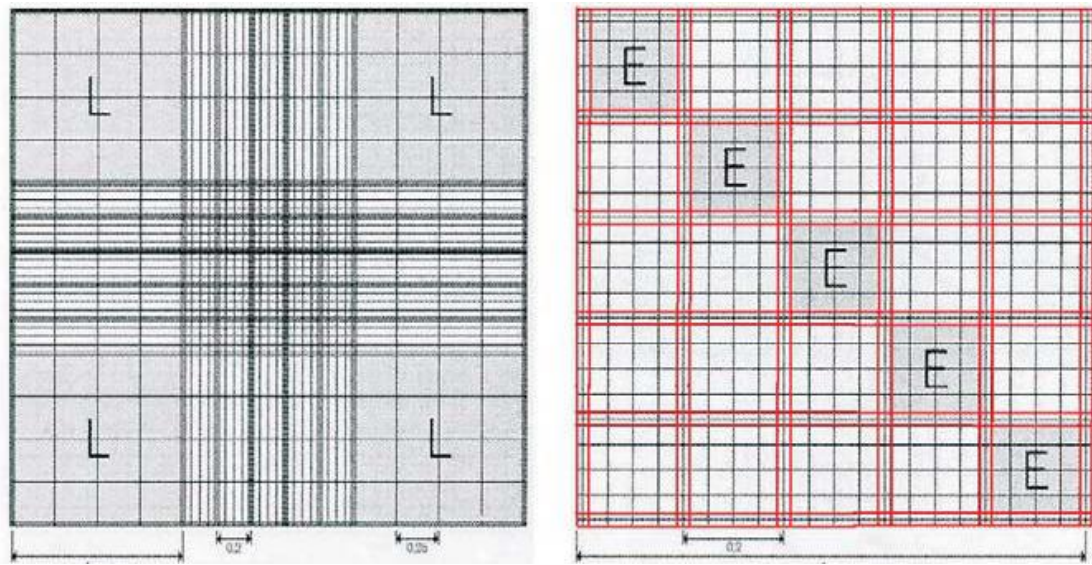


Figura 5. Cámara Neubauer la cuadrícula central (gráfica derecha) se utilizará para el recuento de las levaduras. La gráfica izquierda es la ampliación de la cuadrícula central de la gráfica derecha y donde se especifica mediante la letra E donde se hará el recuento.

Una vez definido las áreas para hacer los recuentos aplicaremos la siguiente fórmula, en donde los conteos de células teñidas serán numeradas aparte pues esto nos dará un indicio del índice de mortalidad de las sustancias químicas agregadas.

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = x \text{ millones de levaduras / mL}$$

5.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para la producción del inóculo de la levadura se toma el mismo procedimiento descrito anteriormente ya con las modificaciones descritas del uso de la temperatura correcta y la aceptación del bicarbonato de sodio en las concentraciones propuestas; para la utilización de suspensión de esporas de la cepa de *Penicillium* spp. fueron colectadas a partir de cultivos con dos semanas de incubación a 25 °C mediante inmersión del cultivo en agua destilada estéril conteniendo 5 mL·litro⁻¹ de Tween 80, posteriormente se filtra a través de dos capas de gasa de algodón esterilizada (Qin *et al.*, 2006). El conteo de esporas se efectúa empleando la cámara de Neubauer, para ajustar la concentración de esporas a 10⁴ conidios·ml⁻¹ (Torres *et al.*, 2007).

5.6 DESARROLLO DEL BIOREACTOR

El biorreactor se trabajará por lote para ello se dispondrá de un erlenmeyer provisto de un agitador magnético en su interior, taponado con un apósito tal como se ve en la figura 5 y sumergido a mitad sobre

baño maría que sostiene la temperatura óptima de crecimiento de la cepa en estudio.

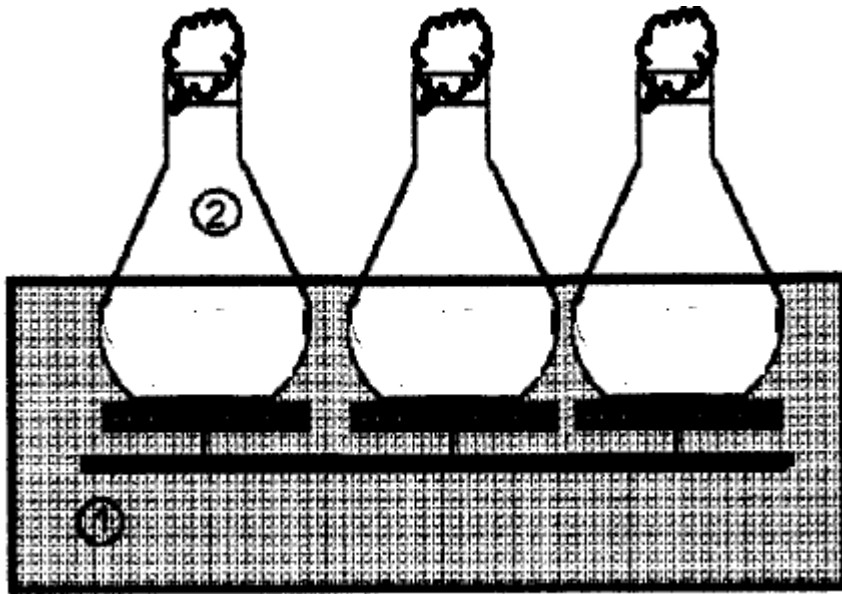


Figura 5. Arreglo experimental para el cultivo de la cepa *C. guilliermondii*. 1- baño a temperatura controlada. 2-Erlenmeyer de 125ml

5.7 BIOENSAYOS (*in vivo*)

Todas las muestras serán evaluadas por grupos de un total de 40 naranjas ‘Tangelo’ que serán desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio a 15 g·litro⁻¹ durante 30 segundos para posterior secado bajo la cámara de flujo laminar. Éstas son heridas en su zona ecuatorial con cuatro perforaciones equidistantes (3 mm por lado).

5.7.1 Protección con Bicarbonato de Sodio (BCS); los frutos serán sumergidos en 0,20 o 40 g/litro-1 de solución de BCS (0, 2 y 4 %) (NaHCO_3 J. Baker Co., EE.UU.) durante 2 min a 20 ± 1 °C. Posteriormente, los frutos se secan bajo flujo laminar y en cada herida se inoculan con 20 μL de la suspensión de esporas de *Penicillium* spp. (200 esporas) y, después de secar las heridas, los frutos fueron colocados en bolsas plásticas esterilizadas con etanol al 90% e incubados a 25 ± 1 °C con 90 ± 5 % HR.

5.7.2 Protección con Etanol; las naranjas serán sumergidas por 5 minutos en soluciones de etanol a concentraciones de (5, 25 y 50%) para luego ser secados bajo cámara de flujo y en cada herida son inoculadas con nuestro agente putrefactor en las mismas concentraciones expuestas previamente y llevadas al mismo lugar de incubación.

5.7.3 Protección mixta; los frutos sin desinfectar serán sumergidos en la solución con las diferentes concentraciones de etanol ya anteriormente comentadas por diez minutos evaporadas en la cámara de flujo, para luego adicionar la solución de BCS bajo los porcentajes de de 2 y 4 %.

Posteriormente, los frutos se secan bajo flujo laminar y en cada herida se depositan 25 μL de la suspensión de la levadura (250,000 células) (Qin *et al.*, 2006). Una hora más tarde las heridas se inoculan con 20 μL de la suspensión de esporas de *P. expansum* (200 esporas) y, después de secar las heridas, los frutos serán colocados en bolsas plásticas de esterilizadas con etanol al 90% e incubados a 25 ± 1 °C con 90 ± 5 % HR.

6. DISCUSIÓN

Se analizó la información obtenida sobre las rutas metabólicas seguidas por la levadura *C. guilliermondii*, para producir sus principales metabolitos. Todos estos de gran importancia ya que son utilizados en gran variedad de industrias incluyendo farmacéutica, agro, enología, cervecería, la industria alimentaria, etc.

Se demostró mediante fuentes bibliográficas que la utilización de la levadura *Candida guilliermondii* como biocontrolador de frutas y verduras frescas para aumentar su vida útil en postcosecha es posible ya que la generación de metabolitos antagónicos y su misma cobertura celular evitan la germinación de sus esporas y el control de crecimiento de microhongos putrefactores; tal como se ha analizado las cepas nativas que han sido aisladas de la filósfera tienden a generar fotoprotectores que permiten sobrevivir a los rayos ultravioletas generados por la exposición al sol esto hace factible que la cepa aislada por PUJ pueda sobrevivir a su aplicación sobre los frutos de la naranja justo después de su cosecha, permaneciendo activa durante su transporte del campo hasta los expendios de frutas bajo condiciones extremas de humedad relativa y humedad de superficie.

Se pretende que una vez evaluado los porcentajes de efectividad del producto en sus dosis estudiadas y procedimientos estipulados sea llevado al campo para que el mismo agricultor lo implemente.

7. CONCLUSIONES

La obtención de alcoholes, esteres y ácidos, tradicionalmente son obtenidos por métodos químicos. Esta investigación resume la posibilidad de obtención biológica, amigable con el medio ambiente y eficaz de estas sustancias.

Lo que se busca mediante estos procedimientos es la estandarización de una técnica que permita abrir la posibilidad de ofrecer a los agricultores tratamientos naturales de impacto ambiental positivo a sus frutas cosechadas desde el momento del corte y evitar así el uso de fungicidas; permitiendo a Colombia el aumento de los productos orgánicos en fresco de mayor durabilidad y gran calidad. La especie *Candida guilliermondii* ofrece grandes posibilidades así como la mayoría de otras levaduras estudiadas como antagonistas lo que abre posibilidades biotecnológicas más amplias que apoyen los cuartos de atmósfera modificados.

La conservación de frutas y verduras en su estado fresco por largos periodos favorecerá precios más estables a lo largo de todo el año no dependiendo tan drásticamente de las cosechas regionales, se hace necesario a su vez la culturización de los agricultores, empacadores y

comerciantes lo importante que es el buen manejo de la fruta, los golpes, el aplastamiento y el almacenamiento en sitios inadecuados harán más propenso la conservación de esta fruta. Cabe anotar que en Colombia no hay cuartos con atmósferas modificadas, por su complejidad costos altos y el hecho que a pesar de que las cosechas no son cada mes; aun así la diversidad de climas y suelos permiten su disponibilidad durante todo el año, aun así para los expendedores de jugos como en Restaurantes y Hoteles estelares se hace necesario contar con suministros permanentes.

8. BIBLIOGRAFIA

- ABADIAS M , VIÑAS I, TEIXIDÓ N, TORRES R. Y USALL J. (AÑO) Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas.
- ABSOGER. Fábrica de Atmósferas controladas y ULO. Disponible en internet en <http://www.absoger-atmosphere-controlee-azote.com>
- ANDERSEN B *et al.* 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research.
- ANDERSEN B, Thrane U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *A. alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. Canadian Journal of Microbiology.
- ATSUMI S,HANAI T,LIAO J. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. Revista científica. NatureYear:2008b451868910.1038/nature0645018172501
- BANERJEE S, ARCHANA A, SATYANARAYANA T. (1994) Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. sulfurea TMD-8. Curr. Microbiol.
- BARAK Z, CHIPMAN D, GOLLOP N. Physiological implications of the specificity of acetohydroxy acid synthase isozymes of enteric bacteriaJ BacteriolYear: 1987169375037563301814

- BUITRAGO E. Jonathan. ESCOBAR, Angélica María. (2009). Aplicación de la levadura *Candida* spp. como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- CANN A., LIAO J. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli* Appl Microbiol Biotechnol Year:200881899810.1007/s00253-008-1631-y18758769
- CANN A ; LIAO J. Pentanol isomer synthesis in engineered microorganisms. 2008
- CHAVES VM, Converti A, Lopes Passos FM, Cavalcante Coelho JL. Sampaio FC. (2008) Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. Bioresour Technol.
- CHEN LF, GONG CS, TSAO GT. (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. Biotechnol. Lett.
- CHEN X, JIANG Z H, CHEN S, QIN W. (2010) Microbial and Bioconversion Production of D-xylitol and Its Detection and Application. *Int J Biol Sci*;
- DAHIYA J, S. (1991) Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. Can. J Microbiol.
- DESHPANDE V, PHADTARE S, RAO M, RAWAT U. (1996) A novel xylose isomerase from *Neurospora crassa*. Biotechnol. Lett.

- DOBROWOLSKI P, GANESAN B, WEIMER BART. 2006. Identification of the Leucine-to-2-Methylbutyric Acid Catabolic Pathway of *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol
- FLANZY CLAUDE, 2003, Enología. Fundamentos científicos y tecnológicos, editorial AMV ediciones, Madrid España, pags: 279-280
- GOLLOP N,DAMRI B,CHIPMAN DM,BARAK Z. Physiological implications of the substrate specificities of acetohydroxy acid synthases from varied organismsJ BacteriolYear: 1990172344434492345154
- Graeme M. Walker. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Primera edicion. Ed. Wiley. Chichester, Inglaterra. Pp 3-200. http://books.google.com.co/books?id=8rR-6Prg3TcC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- GUO C, ZHAO C, HE P, LU D, SHEN A, JIANG N. (2006) Screening and characterization of yeasts for xylitol production. J Appl. Microbiol.
- HÄRKÖNEN M, NUOJUA P. (1979) Eri tekijöiden vaikutus ksyloosin katalyyttiseen hydraukseen ksylitoliksi. Kemia-Kemi.
- HIMIZU E,OOSUMI T,HEIMA H,TANAKA T,KURASHIGE J,ENEI H,MIWA K,NAKAMORI S. Culture conditions for improvement of L-threonine production using a genetically self-cloned L-threonine hyperproducing strain of *Escherichia coli* K-12Biosci Biotechnol BiochemYear:1995591095109810.1271/bbb.59.10957612996

- L, KOIVISTOINEN P, VOIROL F. (1982) Food technological evaluation of xylitol. Adv. Food Res.
- IGEM. Massachusetts Institute of Technology. 2009. disponible en internet: <http://2009.igem.org/Team:HKUST/Back3>
- Infoagro.com. (1997). Técnicas para el control de *Botrytis* (primera parte) (en línea). España. Consultado 22 marzo 2011. Disponible en <http://www.infoagro.com/abonos/botrytis.htm>
- ISHIZAKI H, IMAI T, SHIMAMURA M, YOSHITAKE J. (1973) Xylitol production by an *Enterobacter* species. Agric. Biol. Chem.
- ISHIZAKI H, IMAI T, SHIMAMURA M, YOSHITAKE J. (1976) Xylitol production by *Enterobacter liquefaciens*. Agric. Biol. Chem.
- IZUMORI K, TUZAKI K. (1988) Production of xylitol from D-xylulose by *Mycobacterium smegmatis*. J Ferment. Technol.
- KOSHKIN N. I., SHIRKÉVICH M. G. (AÑO) Manual de Física Elemental. Edt. Mir. págs 36, 74-75, 85-86. 1975.
- LACHKE A H, JEFFRIES T W. (1968) Levels of the enzymes of the pentose phosphate pathway in *Pachysolen tannophilus* Y-2460 and selected mutants . *Enz. Microb. Technol.*
- LEE KH,PARK JH,KIM TY,KIM HU,LEE SY. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine productionMol Syst BiolYear:2007314910.1038/msb410019618059444

- LIAW WC, CHEN CS, CHANG WS, CHEN KP. (2008) Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolyzate by polyacrylic hydrogel thin films with immobilized *Candida subtropicalis* WF79. J Biosci. Bioeng.
- LIBKIND Frati, Diego. MOLINÉ Martín. Levaduras nativas del PNNH como fuente de compuestos fotoprotectores .2005. Disponible en internet <http://boutwww.bariloche2000.com/archivo/archivo-economia/10216.html>
- LIZCANO R. Andrea Jimena, VERGARA G. Jenny lisseth. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* Frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos, Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- MARIA F, BARBOSA S, DE MEDEIROS MB, DE MANCILHA IM, SCHNEIDER H, LEE H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol fromd-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J Ind. Microbiol. Biotechnol.
- MORBACH S ,SAHM H, EGGELING L. L-Isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: further flux increase and limitation of exportAppl Environ MicrobiolYear: 1996624345435116535457
- MOSS MO. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. pp. 37-56 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- OBANDO GARZÓN, Marcela. (2010). Evaluación del estado del arte de la levadura *Candida guilliermondii* sobre deshidratación de

frutas y otras aplicaciones industriales. Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

- ORTEGON F, Claudia Patricia. RAMIREZ C, Carmen Cecilia. (2001). Evaluación preliminar de los efectos de la inoculación de una cepa de levadura extraída de tomates heteroinjertados (SQB) sobre variedades de tomates comerciales. Tesis. (Bacteriología) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- PALOMO M. Enrique. (2009). Técnicas para el control de *Botrytis* pp. 4 en: *Revista Tecnovid*. editores. Asaja Valladolid.
- PÉREZ J, MUÑOZ-DORADO J, RUBIA T, (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. *Int. Microbiol.*
- PITT J. I, HOCKING AD. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London.
- POVEDA P. Diana Catalina. (2006) Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*lycopersicon esculentum* Mill.) Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- ROMERO, Jenny. (2002). Efecto antagónico de *Candida rugosa* sobre microorganismos contaminantes de la uchuva nativa (*physalis peruviana*) Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

- SÁEZ, Pedro Benito. (2010). Nariz de oro: Alteraciones en el vino ligadas a levaduras. Disponible en internet: <http://urbinavinos.blogspot.com/2010/06/alteraciones-en-el-vino-ligadas.html>
- SAMARAJEEWA U. (1991). In situ degradation of mycotoxins by physical methods. En: Smith & Henderson, eds. Ibid.
- SANFENG Chen, WENSHENG Qin Xi Chen, ZI-HUA Jiang,(2010). Review Microbial and Bioconversion Production of D- xylitol and Its Detection and Application. International Journal of Biological Sciences.
- SHEN C, LIAO J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathwaysMetab EngYear: 20081031232010.1016/j.ymben.2008.08.00118775501
- SMILEY K. L, BOLEN P. L. (1980). Demonstration of D-xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus* . *Biotechnol. Lett.*
- SMITH J. E, ROSS K. (1991). The toxigenic Aspergilli. pp. 101-108 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- SOTO-MUÑOZ, L., MARTINEZ-PENICHE, R. A. (2009). Efecto de levaduras antagónicas y bicarbonato de sodio sobre *Penicillium expansum* en dos variedades de manzanas. Universidad autónoma de queretaro.

- SURYADI H, KATSURAGI T, YOSHIDA N, SUZUKI S, Tani Y. (2000). Polyol production by culture of methanol-utilizing yeast. *J Biosci. Bioeng.*
- T. Satyanarayana y Gotthard Kunze. 2009. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Primera edición. Ed. Springer. Berlin. Pp 295-301.
(http://books.google.com.co/books?id=jLFmiervaqMC&pg=PA295&dq=erten+2002+yeast+ethyl&hl=es&ei=VPOzTNOzKoWB1AfUg73qCw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q=erten%202002%20yeast%20ethyl&f=false)
- Universidad de Florida A taste of flavor research. (AÑO) disponible en internet <http://www.hos.ufl.edu/kleeweb/flavorresearch.html>
- URIBE G. Liz Alejandra.(2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- VEGA C, Yuly liliana. (2007). Evaluación y selección de auxiliares de formulación para la fotoestabilización de la levadura biocontroladora *Pichia onichis* frente a la radiación ultravioleta Tesis. (Microbiología Industrial) Bogotá D.C. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- WEBSTER J. (1986). *Introduction to Fungi*. 2º ed. Cambridge University Press.
- YILIN Cao & Co. (1995) laboratorio por investigadores del Centro Médico de la Universidad de Massachusetts en Worcester.

- YOSHITAKE J, OHIWA H, SHIMAMURA M, IMAI T. (AÑO) Production of Polyalcohol by a *Corynebacterium* sp Part I. Production of Pentitol from Aldopentose. Agric Biol Chem.
- ZHU L, O'DWYER JP, CHANG VS, GRANDA CB, HOLTZAPPLE MT. (2008) Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. Bioresour Technol.