



Facultad de Ingeniería

Proyecto Integrador Profesional

Ingeniería Química

***TITULO: Producción de biomasa de una levadura nativa en cultivo
semicontinuo con potencial aplicación en la industria frutícola***

Autora:

Bianca Caroline Frazão Borges

Dirección de tesis:

Directora: Dra. Marcela Sangorrín

Codirectora: Dra. Florencia Gorordo

Tesis presentada para la obtención del título de grado en Ingeniería Química

Neuquén, Argentina- 2024

AGRADECIMIENTOS

Primero, quisiera agradecer a mi familia: mi hermana, mi hermano, mi mamá y a mi compañerita de cuatro patas. El apoyo incondicional de ustedes me dio aliento cuando lo necesité para seguir. Gracias hermana por acompañarme en largas tardes de estudio, y por creer siempre en mí. Siempre fuiste un gran apoyo e inspiración para mí. Gracias hermano por ayudarme con todo lo relacionado a la tecnología, y con todo problema que tuviera con la computadora y por siempre alegrarte por mí. Gracias mamá por siempre inspirarme a estudiar, tu ejemplo fue muy importante para mí. Gracias a mi pequeña de cuatro patas Tracy, por estar acompañándome en casa durante las largas jornadas de estudio y repaso y porque con solo su presencia transmitirme paz.

A mi co-directora la Dra. María Florencia Gorordo, por acompañarme en todas esas mañanas y tardes y a veces madrugadas para realizar los ensayos, por su paciencia, por sus ánimos y por además estar dispuesta a explicarme y guiarme desde lo más mínimo hasta el cálculo más complejo. Muchas gracias por siempre escucharme y entender que mis tiempos a veces se alargaban por el trabajo. Muchas gracias por todo Flor.

A mi directora de Tesis, la Dra. Marcela Sangorrín. Desde la primera reunión fue muy cálida y entusiasta al recibirme para la realización de este trabajo de Tesis. Gracias por guiarme en este recorrido.

A la empresa La Deliciosa (Centenario, Neuquén), que dispuso de sus instalaciones, mano de obra, insumos y frutas para poder realizar los experimentos durante la temporada. A todos mis amigos y amigas, ya sea de la secundaria, de la facu o de la vida. A los amigos de la facu hago esta mención. Gracias por tanto apoyo incondicional, ya sea con tardes de estudio, un apunte, o simplemente sus palabras de aliento. Al resto de mis amigas/os y a las personas que llegaron a mi vida hace poco, gracias por estar presentes de una forma u otra y acompañarme desde su lugar durante esta última etapa. Gracias a todos ustedes por la sorpresa del último final. Ese momento lo voy a llevar siempre conmigo.

Por último, a la Universidad Nacional del Comahue. Agradecida a la Educación Pública y gratuita por darme la oportunidad de formarme en la carrera que elegí cuando era muy chica. Gracias también a todos los profesores y profesoras de esta Universidad, que me han dejado muchas herramientas para seguir mi camino profesional.

RESUMEN

El Alto Valle de Río Negro y Neuquén constituye unas de las principales áreas productoras y exportadoras de peras de Argentina, concentrando el 90% de la superficie de la producción de peras y manzanas del país. Las variedades con mayor volumen de exportación son Beurrè D'Anjou y Packham's Triumph, las cuales se almacenan en cámaras frigoríficas (-1 a 0°C y 95% HR) entre 3 y 7 meses. Es durante este periodo donde se producen grandes pérdidas por la aparición de enfermedades postcosecha. Los importantes presentes en esta etapa son *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, como también en los últimos años han aparecido en la región *Alternaria-Cladosporium spp.* El uso de fungicidas químicos ha sido una práctica habitual y efectiva como primera medida en el control de enfermedades postcosecha en diversos cultivos. Sin embargo, está siendo actualmente reconsiderada debido a los problemas de toxicidad que provoca.

El Control Biológico se presenta como una alternativa prometedora para sustituir el uso de fungicidas químicos en el manejo de enfermedades postcosecha, ofreciendo varias ventajas significativas tanto para la sostenibilidad ambiental como para la producción de fruta orgánica. En este sentido, se ha aislado y seleccionado previamente en el laboratorio de Biología y Biotecnología de Levaduras del PROBIEN la levadura *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263. El empleo de esta levadura como agente de control biológico (ACB) se encuentra patentado por el CONICET y la Universidad Nacional del Comahue (20120101053) y lleva como título "Cepas de levadura para el biocontrol de frutas post cosecha, composiciones que las contienen, métodos de aplicación de las composiciones y usos".

En esta Tesis se utilizaron dos medios de cultivo previamente optimizados basados en residuos agroindustriales para la producción de biomasa de la levadura. Se utilizó un medio basado en suero de queso en polvo (SQP) de composición: SQP, 80 g/L; (NH₄)₂SO₄ 1,2 g/L; KH₂PO₄, 10 g/L; y otro basado en mosto de manzana (MM) de composición: MM, 44% v/v; KH₂PO₄, 7,3 g/L y urea, 2 g/L. Con estos medios de cultivo se llevó a cabo la producción de biomasa de la levadura en dos reactores semicontinuos (RSC) de 27 L.

Al evaluar los distintos parámetros cinéticos y de producción de biomasa en los dos medios de cultivo, se encontraron similitudes cuando se compara productividades y rendimientos en la producción de la levadura antagonista. En cuanto a la biomasa obtenida, se obtuvo

mayor biomasa cuando se empleó el medio de cultivo MM, las levaduras viables (UFC) fueron 3 órdenes de magnitud mayores en comparación a las obtenidas empleando el medio de cultivo SQP.

La biomasa obtenida en ambos medios de cultivo fue evaluada en ensayos a escala semicomercial. Se determinó la incidencia natural de las enfermedades naturales causadas por *P. expansum*, *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium spp.* Al obtener los porcentajes de control, se pudo ver que estos superan el 40% y en algunos casos alcanzan el 100% de control para *B. cinerea* cuando la levadura antagonista crece en el medio MM. Cuando la biomasa es aplicada inmediatamente luego de su producción, los porcentajes de control son mayores que cuando la biomasa fresca se conserva un tiempo a 4°C.

En términos generales, los ensayos mostraron que la incidencia de enfermedades provocadas por los hongos fitopatógenos fue mayor en pera que en manzanas, así mismo, los porcentajes de control con el ACB fueron superiores en peras.

El uso de *V. victoriae* como ACB es una herramienta con un gran potencial para el control de enfermedades fúngicas en la producción de fruta orgánica de la zona. El empleo de esta levadura antagonista permitiría reducir o sustituir el uso de fungicidas químicos, evitando así el impacto negativo de estos últimos en la salud de los consumidores y del medio ambiente.

ABSTRACT

The high Valley of Río Negro and Neuquén constitutes one of the main pears producing and exporting areas in Argentina, concentrating 90% of the country's pear and apple production area. The varieties with the highest export volume are Beurrè D'Anjou and Packham's Triumph, which are stored in cold rooms (-1 to 0°C and 95% RH) between 3 and 7 months. It is during this period where large losses occur due to the appearance of postharvest diseases. During the storage period the fruit is susceptible to being attacked by various phytopathogenic fungi, the most important present at this stage are *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*, as well as in recent years *Alternaria-Cladosporium spp* have appeared in the region. The use of chemical fungicides has been a common and effective practice as a first measure in the control of postharvest diseases in various crops. However, it is currently being reconsidered due to the toxicity problems it causes.

Biological Control is presented as a promising alternative to replace the use of chemical fungicides in the management of postharvest diseases, offering several significant advantages both for environmental sustainability and for the production of organic fruit. In this sense, the yeast *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263 has been previously isolated and selected in the PROBIEN Yeast Biology and Biotechnology laboratory. The use of this yeast is patented as a biological control agent (BCA) by CONICET and the National University of Comahue (20120101053) and carries as title “Yeast strains for biocontrol of post-harvest fruits, compositions containing them, methods of application of the compositions and uses.”

In this Thesis, two previously optimized culture media based on agroindustrial waste were used for the production of yeast biomass.

In this Thesis, two previously optimized culture media based on agroindustrial waste were used for the production of yeast biomass (Gorordo, 2024). A medium based on whey cheese powder (CWP) of composition was used: CWP, 80 g/L; (NH₄)₂SO₄ 1.2 g/L; KH₂PO₄, 10 g/L; and another based on apple must (AM) with composition: AM, 44% v/v; KH₂PO₄, 7.3 g/L and urea, 2 g/L.

With these culture media, the production of yeast biomass was carried out in two 27 L semi-continuous reactors (SCR).

When evaluating the different kinetic and biomass production parameters in the two culture media, similarities were found when comparing productivities and yields in the production of the antagonist yeast. Regarding the biomass obtained, greater biomass was obtained when the AM culture medium was used, the viable yeasts (CFU) were 3 orders of magnitude greater compared to those obtained using the CWP culture medium.

The biomass obtained in both optimized culture media was also evaluated in semi-commercial scale trials. The natural incidence of natural diseases caused by *P. expansum*, *B. cinerea* and *Alternaria-Cladosporium spp.* was evaluated. When the control percentages obtained were evaluated, they exceeded 40% and, in some cases, reached 100% control for *B. cinerea* when the antagonist yeast grew in the AM medium. When the biomass is applied immediately after its production, the control percentages are higher than when the fresh biomass is stored for a period of time at 4°C.

In general terms, the trials showed that the incidence of diseases caused by phytopathogenic fungi was higher in pear than in apples, however, the control percentages with CBA were higher in pears.

The use of *V. victoriae* as CBA is a tool with great potential for the control of fungal diseases in organic fruit production in the area. The use of this antagonist yeast would allow the use of chemical fungicides to be reduced or replaced, thus avoiding the negative impact of the latter on the health of consumers and the environment.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	A
INTRODUCCION	1
1 Producción de fruta de pepita en Argentina	1
1.1 Producción orgánica de frutas.....	2
1.2 Procesamiento de la fruta para consumo en fresco	2
2 Pérdidas postcosecha en frutas	5
2.1 <i>Penicillium expansum</i>	6
2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	8
2.3 <i>Alternaria-Cladosporium</i> spp.....	9
3 Manejo de enfermedades postcosecha	10
4 Control biológico postcosecha	10
4.1 Mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACB)	11
4.2 Levaduras como ACB	13
4.3 <i>Vishniacozyma victoriae</i> como ACB	15
5 Métodos de producción de biomasa	16
5.1 Cultivo <i>batch</i> o lote.....	16
5.2 Cultivo semicontinuo	17
6 Sustratos económicos para la formulación de medios de cultivo.....	17
6.1 Suero de queso en polvo	18
6.2 Mosto de manzana	19
7. Ensayos a escala semicomercial.....	20
OBJETIVOS	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
MATERIALES Y METODOS	23
1 Equipamiento utilizado	23
2 Medios de cultivo	24
2.1 Medio de cultivo sólido.....	24
2.2 Medios de cultivo líquido.....	24
3 Material biológico y vegetal.....	25
3.1. Microorganismo y preparación de inóculo.....	25
3.2 Frutas de producción orgánica	25

4. Métodos analíticos	26
4.1 Cuantificación del crecimiento de las levaduras	26
4.2 Cuantificación de azúcares.....	26
4.3 Cuantificación de nitrógeno libre.....	26
4.4 Determinación de Proteínas	27
4.5 Determinación de parámetros cinéticos	27
4.6 Determinación de parámetros de producción.....	28
5 Producción de biomasa en reactor.....	29
5.1 Reactor semicontinuo.....	29
6 Separación de levaduras del medio de cultivo por filtración tangencial.....	30
7 Ensayos en línea de empaque.....	31
7.1 Aplicación de las levaduras antagonistas	31
7.2 Efecto del sistema de aplicación sobre las levaduras	32
7.3 Capacidad de colonización de las levaduras sobre la superficie de fruta.....	32
7.4 Análisis estadísticos	33
RESULTADOS.....	35
1 Producción de biomasa en reactor semicontinuo	35
1.1 Medio de cultivo basado en SQP	35
1.2 Medio de cultivo basado en MM	36
2 Ensayo en línea de empaque de producción orgánica.....	38
2.1 Aplicación y colonización de la superficie de la fruta de la levadura.....	39
DISCUSIÓN.....	42
1 Comparación de la producción de biomasa con los dos medios de cultivo utilizados.....	43
2 Proceso <i>downstream</i>	44
3 Evaluación de la capacidad antagónica de <i>V. victoriae</i> en ensayos a escala comercial...	45
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

ABREVIATURAS

ACB: Agente de control biológico

ADE: agua destilada estéril

AVRNyN: Alto Valle de Río Negro y Neuquén

CB: Control Biológico

FAN: nitrógeno fácilmente asimilable

GRAS: Generally Regarded As Safe (Considerados generalmente como seguros)

h: Horas

ha: Hectárea

HR: Humedad relativa

I (%): Incidencia

Kg: Kilogramo

k_{La} : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

MM: Mosto de manzana

p/p: peso/peso

PS: peso seco

p/v: peso/volumen

ppm: Partes por millón

RB: reactor batch

rpm: Revoluciones por minuto

RSC: Reactor semicontinuo

SQ: Suero de queso

SQP: Suero de queso en polvo

SS: sólidos solubles

Tn: Tonelada

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

v/v: volumen/ volumen

$Y_{x/s}$: Rendimiento de biomasa producida con respecto a sustrato consumido

$\mu_{\text{máx}}$: Velocidad máxima de crecimiento

INTRODUCCION

1 Producción de fruta de pepita en Argentina

Argentina se encuentra en el puesto 17 como productora de frutas en general, con 5.322.357 Tn producidas, ocupando el 3° lugar como productor de peras y el 2° lugar como exportador a nivel mundial (siendo el 1° en el hemisferio sur). En cuanto a manzanas, ocupa el 12° lugar como productor, el 5° como exportador mundial y el 2° en el hemisferio sur, después de Chile (Marini et al., 2020). A nivel nacional, el sector frutícola se encuentra en el 7° lugar con el 4% del total de las exportaciones, siendo el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (AVRNyN) quien concentra el 90 % de la superficie en la producción de peras y manzanas del país. La producción anual de peras actual alcanza las 560.000 Tn y si bien la producción es baja en comparación con el período pre-2015, se encuentra en niveles dentro del promedio 2016-2021 (Barrios López, 2022).

Según datos del SENASA, en la región del AVRNyN se registraron 35.699 ha de frutales de pepita, en donde 18.411 ha pertenecen a la pera. De esa superficie total, cerca del 85,8 % se encuentra en la provincia de Río Negro y el 14,2 % restante en la provincia de Neuquén.

La región del alto Valle de Río Negro y Neuquén constituye unas de las principales áreas productoras y exportadoras de peras de Argentina. En cuanto a las principales variedades de peras plantadas (Figura 1): William's Bon Chrétien 7.419 ha, Packham's Triumph 5.375 ha y Beurrè D'Anjou 2.711 ha, Abate Fetel 921 ha y 2.025 ha otras variedades (Beurrè Bosc, Beurrè Giffard, Clapps Favourite y Red Beurrè D'Anjou). En manzanas, Red Delicious constituye el principal varietal con 11.194 ha, seguido de Granny Smith y Gala con 2.167 ha y 2.097 ha, respectivamente (Santagni et al., 2022). El principal destino de la producción de peras se orienta a la exportación, lo que representa el 60%, mientras que el mercado interno constituye el 13% y la industria el 27%. En cuanto a los destinos de exportación de la producción regional, Brasil es un mercado clave. Dicho esto, los principales importadores son Brasil para con 100.000 Tn, Rusia con 88.000 Tn y la Unión Europea con 30.000 Tn, y, en menor medida diferentes países asiáticos y latinoamericanos.

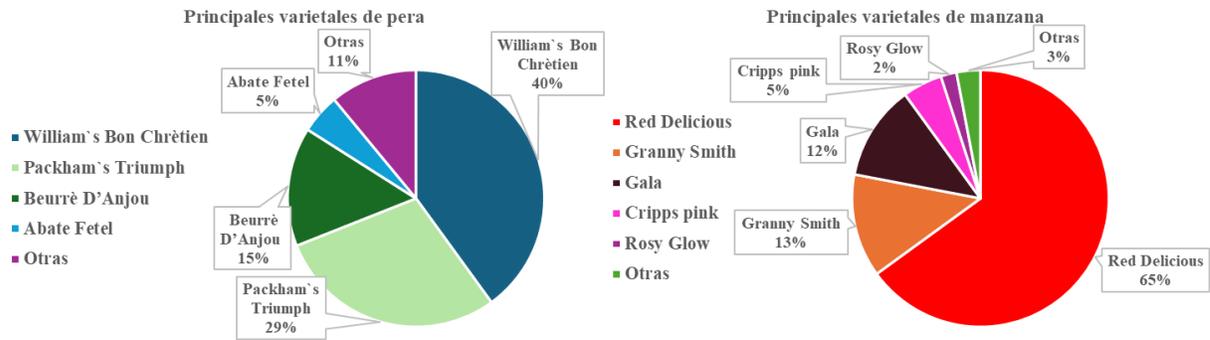


Figura 1: Porcentaje de distribución plantada con las variedades principales de fruta de pepita.

1.1 Producción orgánica de frutas

De las casi 45-50.000 toneladas de frutas orgánicas exportadas por Argentina durante los últimos años, la mayor parte correspondían a manzanas y peras (96-97%). lo que demuestra que la participación de las restantes frutas es mínima (Santagni et al., 2022). La gran ventaja de la región del AVRNYN es su clima seco, prácticamente desértico (230 mm de precipitación al año). Los inviernos fríos, veranos cálidos, gran amplitud térmica entre el día y la noche, a lo que se suma suficiente agua para regar, todos estos factores transforman al AVRNYN en un lugar ideal para la producción de frutas y especialmente la que posee denominación de orgánica. Durante los últimos 10 años la exportación total de peras pasó de las 450.000 toneladas a las 300.000. Durante ese periodo, la de peras orgánicas pasó de 22-24.000 toneladas a 25-30.000, incrementándose el interés tanto de los países importadores como de los consumidores por los productos orgánicos.

1.2 Procesamiento de la fruta para consumo en fresco

Para alcanzar la calidad requerida por los consumidores, las frutas de pepita son sometidas a cuidadosos procesos de cosecha, clasificación, empaque, conservación y distribución. El objetivo de la conservación de los frutos es proporcionar un entorno que permita almacenarlos durante el mayor tiempo posible, sin deteriorar su calidad.

Entendiéndose por calidad a un conjunto de características como sabor, textura, contenido de humedad y otros factores asociados con la aceptabilidad (Lidster y Hildebrand, 1988). Entender la influencia de cada una de las variables que intervienen en la conservación de los frutos es esencial para seleccionar las mejores combinaciones en función del estado de madurez y el destino de las distintas especies y variedades (Herrero y Guardia, 1992).

1.2.1 Proceso de empaque

Después de la cosecha, la fruta es transportada en bins hasta el establecimiento de empaque. Allí se acondiciona, clasifica y embala según el destino que vaya a tener: consumo en mercado interno o exportación. El almacenamiento puede prolongarse desde unos pocos días hasta un año. El proceso de empaque implica una secuencia de operaciones realizadas por máquinas y por personal entrenado para el acondicionamiento, clasificación y embalado (Figura 2). El proceso comienza con la descarga de la fruta contenida en bins en un hidromersor, luego a través de una noria de elevación, la fruta se traslada a través de la línea e ingresa al módulo de lavado y enjuague. El módulo de lavado consiste en cepillos que giran sobre su propio eje y sobre los cuales la fruta avanza rotando por efecto del empuje que provocan los frutos que vienen ingresando por detrás. El lavado se realiza con agua potable sobre los primeros cepillos. A continuación, se aplican productos fitosanitarios destinados al control y prevención de enfermedades patológicas y fisiológicas (producción convencional), aunque también podrían ser biológicos (producción orgánica). El sistema más utilizado es la aplicación mediante boquillas de pulverización. El encerado se realiza en el caso de la manzana para mejorar el aspecto externo del fruto dándole brillo, con el fin de reemplazar la cera natural eliminada en el lavado y reducir la deshidratación. Luego se procede al secado, este proceso se lleva a cabo mediante aire forzado a 30-45°C con ventiladores, para acelerar el secado de la fruta. Posteriormente la fruta se clasifica para su comercialización en diferentes grados de calidad, de acuerdo con la reglamentación vigente y según la estrategia comercial de cada empresa. Esta selección se basa en aspectos de calidad externa de los frutos tales como el color, la forma, la presencia de manchas, heridas, lesiones, etc. Tradicionalmente la clasificación se efectúa en forma manual, pero en

la actualidad existen selectores ópticos de color y sistemas de detección no destructivos que permiten diferenciar la calidad de la fruta de manera automatizada.

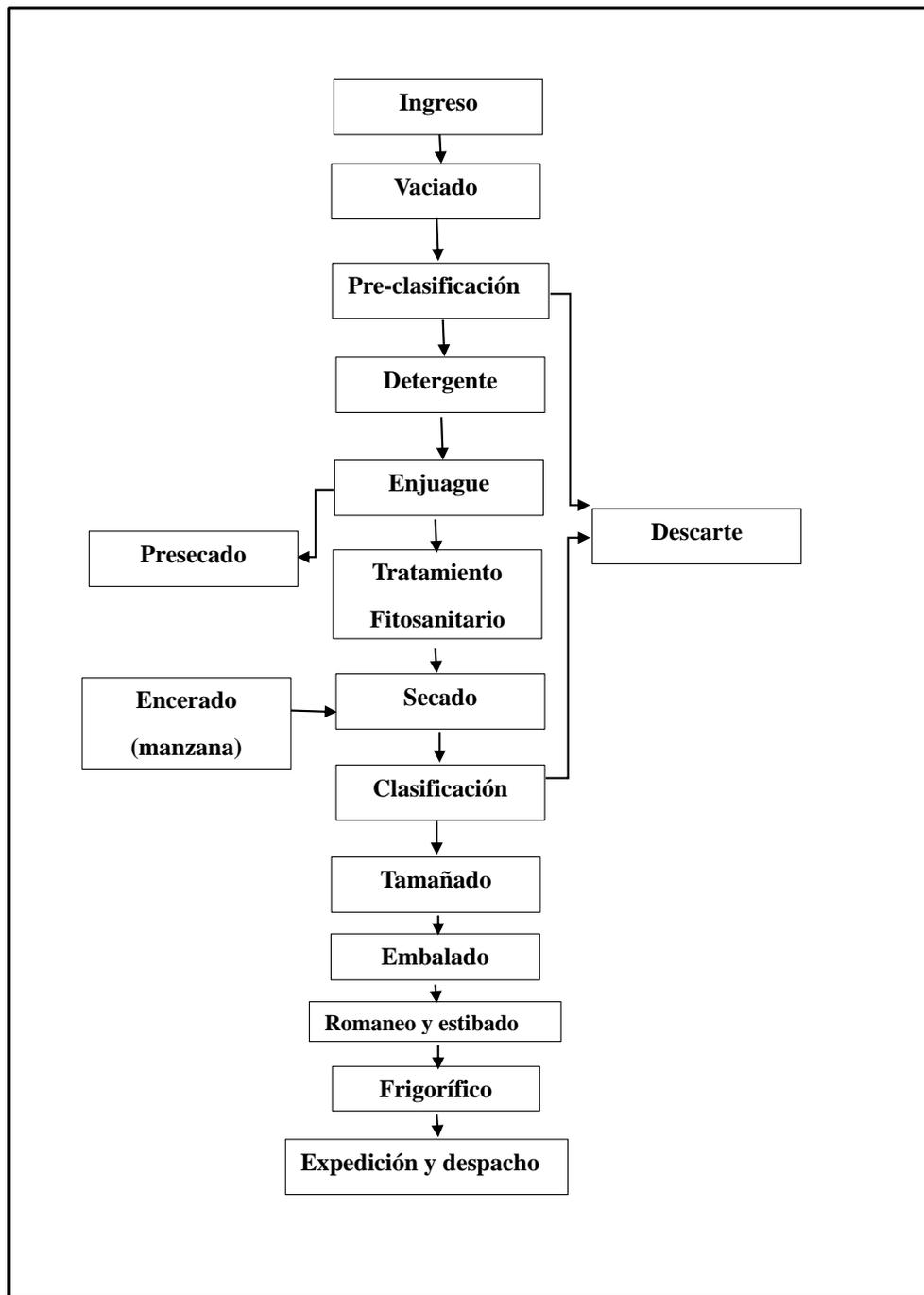


Figura 2: Esquema del procesamiento de la fruta en la línea de empaque para frutales de pepita (peras y manzanas).

1.2.2 Sistemas de almacenamiento de fruta

Al tratar con frutos climatéricos, esta característica les permite tener largos períodos de almacenamiento en cámaras frigoríficas, extendiéndose también su período de comercialización. Los frigoríficos, que luego del período de cosecha se utilizan para conservación, poseen distintas tecnologías. La mayoría son de frío convencional (61 %), en un porcentaje menor son cámaras de atmósfera controlada y modificada (26 %), túneles de preenfriado en menor medida (12%) y atmósfera dinámica, sin encontrarse registros sobre el grado de adopción de la misma en la región. El objetivo del enfriamiento en postcosecha es remover el calor de los frutos para disminuir la tasa respiratoria, reducir la producción de etileno y minimizar la pérdida de agua, con el fin de extender la vida de los frutos durante el almacenamiento. Se intenta disminuir al mínimo los procesos metabólicos que desencadenan la maduración y senescencia natural del fruto. Si la fruta madura durante el período de conservación incrementa su susceptibilidad a las enfermedades de origen fisiogénico y al ataque de los organismos parásitos (Calvo et al., 2018).

El frío convencional, el sistema de conservación más utilizado en la región del AVRNYN, se basa en la conservación a temperaturas en torno a los 0°C, sin que intervengan otros factores reductores del metabolismo. Para las peras, la temperatura óptima de conservación es entre -1 y 0°C. En el caso de las manzanas se mantienen en buenas condiciones con temperaturas entre los -0,5 y 0,5°C, dependiendo de la variedad (Villalba et al., 2016, Calvo et al., 2018). El nivel de humedad relativa toma importancia ya que retarda la pérdida de agua por parte del fruto (deshidratación) y mejora la vida útil del mismo. Este valor debe rondar entre el 90 y 95% (Calvo et al., 2018).

2 Pérdidas postcosecha en frutas

La fruta, al ser un producto perecedero, requiere de tecnologías adecuadas para su conservación que permitan el mantenimiento en el tiempo de sus características organolépticas, así como su apariencia durante el tiempo de almacenamiento (febrero a septiembre), que permitan contar con un producto acorde a las exigencias del mercado durante el mayor período posible. Los sistemas de comercialización modernos exigen la

aplicación de técnicas postcosecha a los productos frutícolas con el objeto de mantener la calidad (apariencia, textura, sabor, valor nutritivo y sanitario) por períodos más prolongados y de reducir las pérdidas entre la cosecha y el consumo.

Las variedades con mayor volumen de exportación en peras son Beurrè D'Anjou y Packham's Triumph, las cuales se almacenan en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95% HR) hasta 7 meses. En las manzanas la de mayor conservación es la variedad Red Delicious (-0,5/0,5°C y 95% HR) las cuales se almacenan hasta 8 meses. Durante la conservación la fruta es susceptible a diferentes enfermedades fúngicas, que se desarrollan invadiendo los tejidos y causando grandes pérdidas por la aparición de enfermedades de postcosecha (Barkai-Golan, 2001). Se destacan principalmente las podredumbres causadas por patógenos fúngicos de diversos géneros, principalmente *Penicillium* y *Botrytis*. Éstas, típicamente se manifiestan después de tres a cuatro meses de conservación en frío, y aumentan considerablemente durante períodos más largos (Li et al., 2007). Además, en la región del AVRNYN, *Alternaria* spp. presenta una creciente importancia como responsable de podredumbres que afectan la calidad y la comercialización en mercados exigentes. En la región del AVRNYN, las pérdidas de frutas de pepita por podredumbres ascienden a U\$S 17 millones anuales (CAFI 2017). Aunque las pérdidas económicas causadas por hongos durante la postcosecha, son variables y no están bien documentadas, se cree que alcanzan entre 30 y 50 %, pero en algunas ocasiones la pudrición puede conducir a la pérdida total del producto (Bautista Baños, 2006).

2.1 *Penicillium expansum*

La podredumbre azul o blanda causada por hongos del género *Penicillium*, en mayor medida *P. expansum*, es la patología postcosecha más importante en manzanas y peras en nuestro país y en todo el mundo. Aparece como lesiones blandas, deprimidas, profundas y de bordes definidos en la epidermis del fruto que varían del color marrón claro a pardo oscuro. La pulpa dañada se presenta blanda y acuosa y se separa fácilmente de los tejidos sanos, siendo éste el principal síntoma de la enfermedad. La superficie de las lesiones más antiguas se cubre de esporas verdes azuladas característica que le da el nombre a la enfermedad (Figura 3). También se lo puede encontrar sobre el pedúnculo del fruto,

principalmente en peras. No forma nidos de frutos podridos porque no se transmite por contacto directo, sino que necesita una herida para colonizar la espóra, sin embargo, los frutos infectados producen numerosas esporas que se diseminan fácilmente por las cámaras y facilitan la dispersión del moho (Mondino, 2009).



Figura 3: Enfermedad causada por el moho azul (*P. expansum*) en peras del varietal Beurré D'Anjou.

A escala global, *P. expansum* puede aparecer durante la temporada de crecimiento, en la cosecha, en almacenamiento postcosecha o transporte. Este ingresa al fruto a través del tejido dañado causado por pájaros, insectos o áreas dañadas próximas a lenticelas (Amiri y Bompeix, 2005). Por otro lado, posee la característica de desarrollarse aún a -1°C . Esta particularidad, más la capacidad de fructificar y producir nuevas infecciones en condiciones de alta humedad y en oscuridad, típicas de las cámaras de almacenamiento, lo convierten en el hongo más importante en conservación en la mayoría de las zonas productoras de fruta de pepita del mundo. A nivel microscópico, se caracteriza por mostrar esporas pequeñas, de forma esférica o elíptica, que parten de una estructura ramificada.

El uso de fungicidas inmediatamente antes o después de la cosecha para prevenir la podredumbre está limitándose cada vez más por legislación, debido a los riesgos para la salud de los consumidores, la contaminación ambiental y la incipiente resistencia de cepas patógenas. *Penicillium expansum*, en particular, se ha vuelto resistente a algunos fungicidas.

2.2 *Botrytis cinerea*

La podredumbre gris es generada por el hongo *Botrytis cinerea*, es un parásito necrótrofo, que produce la muerte de la célula del hospedante provocando una podredumbre progresiva del tejido vegetal infectado. Es la segunda enfermedad en importancia en frutas de pepita en nuestro país.

Generalmente ataca al pedúnculo y origina grandes pérdidas debido a su capacidad de propagarse desde los frutos afectados hacia los sanos durante el almacenamiento. Esta infección fruto a fruto produce el fenómeno denominado anidación, o formación de nidos. Posee consistencia firme, es relativamente seca y no forma depresiones, pero profundiza en la pulpa y genera márgenes difusos. Tiene una coloración marrón que cambia a tonalidades más oscuras con el transcurso del tiempo. Sobre la epidermis de la fruta afectada se desarrolla un micelio blanquecino que evoluciona a gris a medida que el hongo esporula (Figura 4). Además, se pueden desarrollar estructuras oscuras (esclerosis) en la superficie de los frutos. Las infecciones pueden ocurrir antes de la cosecha, en la etapa de campo, y pueden permanecer latentes hasta el almacenamiento, cuando el patógeno toma ventaja para el desarrollo de la enfermedad dadas una mayor humedad relativa y bajas temperaturas (0-5°C), que disminuyen las defensas del hospedante. Se inician por aperturas naturales o heridas mecánicas en el fruto (Romanazzi et al., 2016).



Figura 4: Enfermedad causada por el moho gris (*B. cinerea*) en peras del varietal Beurré D'Anjou.

2.3 *Alternaria-Cladosporium* spp.

La podredumbre negra generada por hongos del género *Alternaria*, es una patología que se desarrolla principalmente en la postcosecha de frutas de pepita en nuestra región. Se trata de una podredumbre con forma redonda y de consistencia firme y seca, de desarrollo lento y tonalidades de colores oscuros, que van desde diferentes tonos marrón hasta el negro. La podredumbre se inicia en la parte exterior del fruto, pero avanza en profundidad hacia el interior, observándose una zona deprimida. A medida que evoluciona, la podredumbre se vuelve ligeramente esponjosa y se va oscureciendo. En condiciones de alta humedad, el moho puede desarrollar un micelio de aspecto algodonoso y de color gris oscuro o negro. Este moho es saprófito y puede sobrevivir en tejidos muertos, debilitados o previamente afectados por otras enfermedades. De hecho, la infección se puede producir en campo, pero no se manifiesta hasta que el fruto madura. Las esporas sobreviven en el campo en los restos orgánicos del cultivo y en el suelo. Los conidios están presentes también en el aire y sobre la superficie de la fruta (Dobra y Rossini, 1993). En las instalaciones del empaque, son fuentes de esporas el agua utilizada en el proceso, el aire y las superficies de la línea de empaque, las paredes y pisos de las cámaras de almacenamiento (Snowden, 2010).



Figura 5: Enfermedad causada por el hongo negro *Alternaria-Cladosporium* spp en peras del varietal Beurré D'Anjou.

3 Manejo de enfermedades postcosecha

En el AVRNYN los principales patógenos de postcosecha de frutas de pepita son *B. cinerea* y *P. expansum*. Por lo tanto, la mayoría de las prácticas de manejo se concentran en el control de estos dos patógenos. Estas son prácticas de carácter preventivo y comienzan por el manejo a campo, realizando prácticas de fertilización y nutrición equilibradas, que estimulen la resistencia natural de los frutos. Durante la cosecha de la fruta, se recomienda evitar golpes y heridas en las mismas, depositándolas en canastas y bins limpios y desinfectados. Es importante, respetar la fecha de cosecha en madurez fisiológica. Finalmente, en planta de empaque se requiere una manipulación cuidadosa para evitar golpes y heridas. Las instalaciones deben presentar una higiene adecuada y se debe proteger a la fruta con fungicidas u otros tratamientos preventivos, acompañadas con el almacenamiento a bajas temperaturas, con altos porcentajes de humedad relativa (HR) y en distintos tipos de atmósferas. Las pérdidas en postcosecha por patógenos de heridas se deberían reducir llevando de manera adecuada las prácticas mencionadas anteriormente. El cumplimiento de estas pautas no resulta suficiente para controlar totalmente a los patógenos postcosecha, debido a ello lo más habitual es añadir productos químicos que aseguren la protección de la fruta.

4 Control biológico postcosecha

El término control biológico (CB) fue utilizado por primera vez por Smith para describir la introducción de enemigos naturales de insectos exóticos para la supresión permanente de plagas de insectos (Smith, 1919). En general, este término incluye prácticamente todas las medidas de control de plagas excepto la aplicación de productos químicos. En este contexto, el control biológico resulta una de las alternativas más prometedoras para la sustitución de los fungicidas en particular por las ventajas que presenta en cuanto a la sostenibilidad ambiental. En diferentes estudios se ha demostrado que el control biológico de enfermedades de postcosecha mediante microorganismos epífitos (bacterias y levaduras) es una alternativa promisoriosa y factible de incorporarse en sistemas de producción de fruta orgánica e integrada (Bettioli et al, 2014; Usall, 2016). El

ambiente confinado y las condiciones ambientales controladas en la cámara frigorífica durante la conservación de postcosecha favorecen el éxito de la aplicación de microorganismos con capacidad de biocontrol. Esta aplicación puede hacerse directamente sobre la fruta en la línea de empaque como *sprays* o por inmersión. De esta manera se protege la superficie completa del fruto, con sus posibles heridas; estas últimas constituyen la principal vía de ingreso de los patógenos (Lutz et al., 2012).

Dicho esto, para que un microorganismo pueda ser considerado un ACB debe reunir ciertas características (Di Canito et al., 2021; Droby et al., 2009; Sharma et al., 2009), pensando en la aplicación directa sobre la fruta durante el almacenamiento postcosecha:

- ◆ Ser genéticamente estable.
- ◆ Ser eficaz en bajas concentraciones.
- ◆ Ser capaz de sobrevivir en el medio ambiente adverso en cuanto a nutrientes y condiciones ambientales del almacenaje: bajas temperaturas y atmósferas controladas o modificadas.
- ◆ Ser capaz de multiplicarse en sustratos de bajo costo, con bajos requerimientos nutricionales.
- ◆ Ser capaz de sobrevivir en condiciones ambientales adversas y lograr formularse con una vida útil prolongada y de fácil aplicación.
- ◆ Ser compatible con las prácticas del procesamiento comercial.
- ◆ No ser patógeno para el hospedante.
- ◆ No producir metabolitos perjudiciales para el ser humano.
- ◆ Ser eficaz frente a un amplio espectro de productos y agentes patógenos, en diferentes condiciones.
- ◆ Ser resistente a los agentes químicos utilizados en el ambiente de postcosecha.
- ◆ Debe tener una ventaja adaptativa sobre patógenos específicos.

4.1 Mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACB)

La actividad antagonista de los agentes de biocontrol ha sido ampliamente demostrada, sin embargo, los mecanismos de acción de la mayoría de los agentes de biocontrol de enfermedades postcosecha son poco conocidos (Nunes, 2012). Los estudios

microbiológicos, microscópicos y/o bioquímicos se han centrado en los mecanismos de biocontrol durante muchos años (Massart y Jijakli, 2007). Estos mecanismos implican una compleja interacción entre el hospedador, el patógeno, los antagonistas y el medio ambiente (Figura 6). Un ACB efectivo suele estar dotado de varios atributos que suelen funcionar de manera conjunta y pueden ser cruciales para controlar el desarrollo de la enfermedad (Jamalizadeh et al., 2011). El estudio y conocimiento de los mecanismos de acción es la base para el desarrollo y la aplicación de levaduras antagonistas, ya que es probable que funcionen a través de múltiples mecanismos, pero en ningún caso se ha encontrado un único mecanismo responsable del control biológico. La competencia por nutrientes (principalmente carbono, nitrógeno y oxígeno) y espacio es considerado uno de los principales mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas contra los hongos patógenos postcosecha (Droby et al., 2016; Nunes, 2012). La competencia se define como el solapamiento de nichos, derivado de una situación en la que existe una demanda simultánea del mismo recurso por parte de dos o más poblaciones microbianas (Droby y Chalutz, 1998). Las principales enfermedades postcosecha son causadas por patógenos de heridas, y para competir con éxito, el agente de biocontrol debe crecer rápidamente, utilizando bajas concentraciones de nutrientes y estar mejor adaptado al medio y a las condiciones de conservación de la fruta (El Ghaouth et al., 2004). De esta manera, agotará los nutrientes disponibles en la herida antes que el patógeno, impidiendo que este utilice los nutrientes para germinar e iniciar el proceso de infección (Nunes et al., 2001).

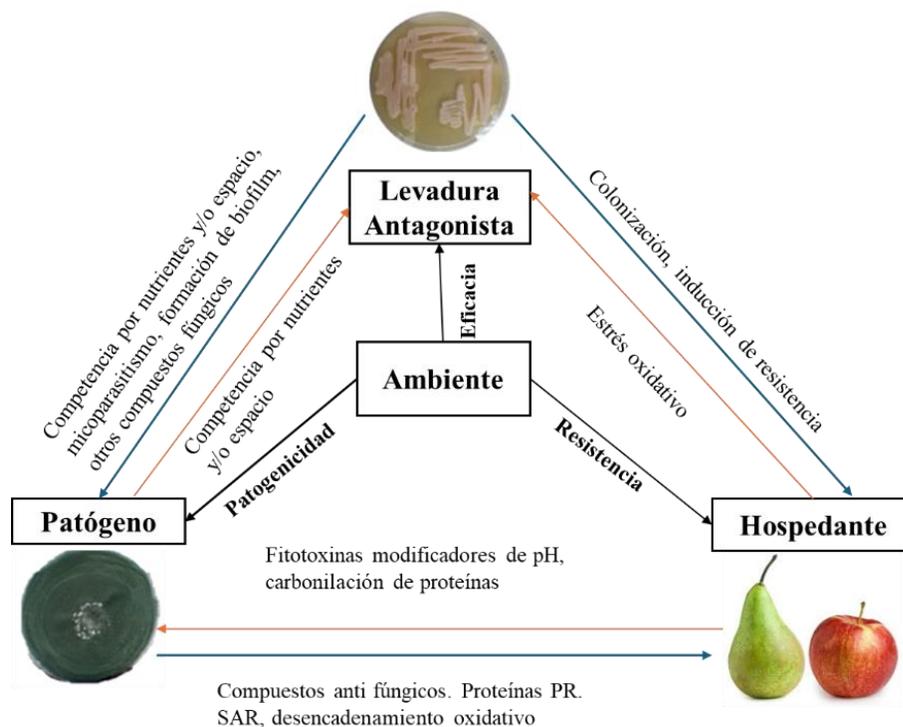


Figura 6: Esquema de las posibles interacciones entre los componentes del sistema de biocontrol: patógeno, levadura antagonista, hospedante y ambiente (Zhang et al., 2020).

4.2 Levaduras como ACB

La mayoría de los estudios sobre potenciales ACB están centrados en las levaduras y muchos menos en las bacterias (Di Canito et al., 2021; Schisler et al., 2011; Spadaro y Droby, 2016; Zhang et al., 2020) ya que muchas de las levaduras son consideradas organismos seguros o GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en microbiomas en todo el mundo, crecen en todo tipo sustratos y ambientes, capaces de colonizar ambientes terrestres, aéreos y acuáticos. Todas las especies de levaduras conocidas hasta el momento asimilan glucosa y fructosa. Por otro lado, las levaduras generalmente tienen una alta tolerancia a las condiciones ambientales estresantes como bajas y altas temperaturas, desecación, amplio rango de humedad relativa, bajos niveles de oxígeno, fluctuaciones de pH, radiación UV, que prevalecen durante las etapas de pre y postcosecha. Además se adaptan al microambiente presente en los tejidos de la fruta, alta concentración de azúcar, alta presión osmótica y bajo pH (Spadaro y Droby, 2016). Debido a estas características y otras, una gran cantidad de los ACB reportados en bibliografía son levaduras.

A nivel mundial, hay algunos bioproductos basados en levaduras que están registrados, formulados y comercializados, pero el alto costo de importación y la inconsistente respuesta en otras regiones y cultivos han dificultado su uso universal (Droby et al., 2009; Usall et al., 2016).

En Argentina, en los últimos años, ha habido un aumento de estudios sobre el uso de levaduras antagonistas para abordar la problemática de los patógenos de postcosecha, aunque ninguno ha llegado aún a la etapa de comercialización. Varios autores han aislado cepas de levaduras a partir de diferentes cultivos y han determinado su capacidad inhibitoria sobre diferentes patógenos. *Rhodotorula rubra* y *Candida pelliculosa* demostraron ser efectivas en el control de *B. cinerea* en tomates en postcosecha en Buenos Aires (Dal Bello et al., 2008). Pesce et al., (2018) probaron la efectividad de distintas cepas de levaduras frente a *Colletotrichum gloeosporioides* en aceitunas en la provincia de San Juan. Nally et al., (2012); Ponsone et al., (2011) aislaron levaduras a partir de uvas, de las provincias de San Juan y Mendoza respectivamente, y las seleccionaron por su capacidad controladora sobre *B. cinerea* y *Aspergillus*. Otros autores han determinado la acción inhibitoria de cepas de levaduras sobre el crecimiento de mohos patógenos (del género *Penicillium*) sobre cítricos de las provincias de Jujuy, Entre Ríos y Tucumán, (Ahrendts y Carrillo, 2004; Visintin et al., 2007; Díaz et al., 2020). El grupo de investigación en el cual realicé mi proyecto integrador profesional seleccionó a *Cystofilobasidium capitatum* por su capacidad controladora sobre *P. crustosum* y *M. piriformis* en frutas finas de la Patagonia (López et al., 2016; Villalba et al., 2016). Así mismo han seleccionado y patentado el uso de levaduras nativas (*Pichia membranifaciens* y *V. victoriae*) con capacidad biocontroladora sobre *P. expansum* y *B. cinerea* en peras (Robiglio et al., 2011, Lutz et al., 2013; Gramisci et al., 2018) en las provincias de Río Negro y Neuquén. Este último caso es el único en el país donde se han optimizado los métodos de producción de biomasa a gran escala y se han evaluado los ACB en ensayos a escala comercial en líneas de empaque (Lutz et al., 2020; Gorordo et al., 2022; Gorordo et al., 2023).

4.3 *Vishniacozyma victoriae* como ACB

La especie *V. victoriae* es una levadura perteneciente al phylum Basidiomycete, clase Tremellomycetes, orden Tremellales (Liu et al., 2015). Se encuentra en ambientes fríos, sin embargo, también es capaz de crecer a temperaturas mayores (Luo et al., 2019). No es capaz de crecer más allá de los 25°C por lo cual no es patógena para los seres humanos. Es capaz de utilizar sacarosa y lactosa como fuente de carbono y energía, así como también glucosa entre otros azúcares (Kurtzman et al., 2011). El primer reporte de esta levadura como agente de control biológico fue realizado por Lutz et al. (2012) frente a *B. cinerea* y *P. expansum* en heridas de pera con la cepa seleccionada *V. victoriae* NPCC 1263. Los posibles mecanismos de acción descritos para esta levadura son: producción de toxinas *killer*, actividad glucanasa, proteasa y quitinasa contra ambos patógenos en condiciones de cámara fría (-1/0°C) y presenta producción de biofilms (Lutz et al., 2013). Así mismo tiene la capacidad de sobrevivir y colonizar las heridas hasta los 120 días de almacenamiento en frío y competir por diferentes nutrientes frente a los fitopatógenos (Gramisci et al., 2018). Además, esta levadura mostró capacidad de inhibir la germinación de los conidios de *P. expansum* (Lutz et al., 2013). Por último las pruebas de patogenicidad realizadas no mostraron crecimiento de *V. victoriae* a 37°C, ni crecimiento en condiciones de simulación gástrica, por otro lado no se detectó actividad fosfolipasa ni formación de pseudomicelio (Lutz et al., 2020). Por lo cual estos ensayos preliminares muestran que *V. victoriae* no tiene características para ser patógena ni oportunista para el ser humano. Por otro lado, Gramisci et al. (2018) evaluaron el efecto de diferentes aditivos sobre el crecimiento de *V. victoriae* y de los hongos patógenos *P. expansum* y *B. cinerea* con el fin de desarrollar una combinación que mejore el biocontrol de estos patógenos en la postcosecha de pera. Se determinó que la manipulación del entorno químico mediante la adición de CaCl₂ 2% da como resultado una actividad antagonista mejorada de *V. victoriae* contra dos enfermedades fúngicas postcosecha de frutos de pera. Estudios realizados en otras partes del mundo y con otras frutas demuestran que *V. victoriae* es un prometedor ACB para reducir la enfermedad causada por *B. cinerea* en kiwi mediante la formación de *biofilm* (Nian et al., 2023), como también se aislaron dos cepas de *V. victoriae* que presentan actividad antagonista frente a *Phlyctema vagabunda* en manzanas orgánicas a 20°C en Chile (Sepúlveda et al., 2022).

5 Métodos de producción de biomasa

Al momento del desarrollo de un ACB de postcosecha debe considerarse que el mismo debe producirse en cantidades suficientes para poder evaluar su capacidad antagonista en condiciones comerciales, es por ello que el proceso de producción debe ser escalado al menos a nivel planta piloto (Patiño Vera et al., 2005).

Existen distintos tipos de cultivo empleados para la producción de biomasa: *batch*, *batch* alimentado, cultivo continuo o cultivo semicontinuo. El tipo de cultivo seleccionado para la producción del antagonista va a depender del fin que persiga tal producción de biomasa. También debe tenerse en cuenta que los nutrientes para un medio deben satisfacer los requisitos básicos para la biomasa celular y la producción de metabolitos, proporcionando un suministro adecuado de energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular (Stanbury et al. 1995).

5.1 Cultivo *batch* o lote

Los cultivos por lotes funcionan como sistemas cerrados. El medio de cultivo se añade al principio del proceso, se inocula el microorganismo a producir y una vez alcanzada la fase de crecimiento deseada, los productos (biomasa + medio de cultivo agotado) se recuperan (Doran, 2013). Si no hay fugas ni evaporación dentro del recipiente, el volumen de líquido se considera constante. El tipo de reactor utilizado para llevar a cabo este tipo de cultivos es el tanque agitado, el cual puede incluir o no, sensores y controles automatizados para monitorear el crecimiento microbiano. El costo de funcionamiento de un reactor discontinuo depende del tiempo necesario para alcanzar la concentración de biomasa deseada o el nivel de conversión del sustrato. El tiempo de cultivo necesario para completar el proceso es importante, ya que, a menores tiempos de producción, menores serán los costos de funcionamiento (Doran, 2013; Shuler y Kargi, 2002). Por otro lado, un frasco Erlenmeyer agitado podría ser considerado para llevar a cabo un cultivo *batch*. Esto hace que sea la primera elección al momento de optimizar medios o para la realización de pruebas preliminares de cultivos.

5.2 Cultivo semicontinuo

El agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo y en algunos casos la acumulación de productos inhibidores limita las densidades celulares obtenidas en los cultivos por lotes, la producción de biomasa y la productividad volumétrica de los cultivos puede aumentarse mediante el tipo de cultivo semicontinuo. En este proceso de producción se cosecha parcialmente una cantidad de medio de cultivo (junto con las levaduras que vienen creciendo en él) a intervalos regulares y luego se añade la misma cantidad de medio fresco al reactor, de manera que las levaduras que permanecen dentro de éste puedan seguir su crecimiento a partir de los nutrientes incorporados. De esta manera se logra mantener a las células en fase exponencial, así la concentración de células aumentará con el tiempo y no se alcanzará el estado estacionario. Este sistema, permite obtener concentraciones de biomasa mucho mayores que las obtenidas en los cultivos *batch*, además presenta la ventaja que se reducen los tiempos y costos que conlleva producir más de un cultivo en lote (Doran, 2013).

6 Sustratos económicos para la formulación de medios de cultivo

Un factor clave a tener en cuenta para llevar a cabo el crecimiento de un microorganismo, es el desarrollo de un medio de cultivo económico que soporte la producción de grandes cantidades del ACB a bajo precio, manteniendo la eficacia del biocontrol (Patiño-Vera et al., 2005; Yáñez-Mendizábal, 2012). Los sustratos para un medio de cultivo económico deben satisfacer los requisitos básicos para la biomasa celular y la producción de metabolitos, brindando la energía suficiente para la biosíntesis y el mantenimiento celular (Stanbury et al., 1995) así como también la producción suficiente de biomasa para alcanzar niveles industriales. El uso de productos comerciales o subproductos de la industria alimentaria como fuentes de nitrógeno y carbono cumplen con la mayoría de los criterios mencionados para formular medios de cultivo, ya que son sustratos baratos que favorecen el crecimiento de los agentes microbianos (Yáñez-Mendizábal et al., 2012; Gorordo et al., 2022). Sin embargo, en algunos casos, la presencia de productos indeseables

y la falta de homogeneidad en los subproductos pueden limitar su utilidad en la producción a grandes escalas (Zhang y Greasham, 1999). El medio deber aportar principalmente hidratos de carbono y compuestos nitrogenados, ya que son los principales nutrientes requeridos para el crecimiento celular y constituyentes de la composición elemental de cualquier microorganismo (Costa et al., 2001). En el primer caso, los sustratos que aportan hidratos de carbono son los granos, melazas, celulosas, suero de queso fresco o en polvo, mosto de uva, residuos de jugueras, entre otros (Armando et al., 2013; Bosso et al., 2020; Ferrari et al., 2001; Gramisci, 2019; Lutz et al., 2020; Zhihui et al., 2008). En el caso de los compuestos nitrogenados, son comúnmente utilizados los de naturaleza inorgánica, como la urea o sales de amonio y algunas de origen orgánico como, extracto de carne, o extracto de malta (Costa, Teixido, et al., 2002).

6.1 Suero de queso en polvo

El suero de queso en polvo (SQP) es un subproducto de la industria láctea, compuesto por lactosa, proteínas, lípidos y sales minerales. El SQP se obtiene del suero deshidratado, previa pasteurización mediante secado spray, siendo esta la principal forma de añadir valor al suero (Lavari et al., 2014; Yang y Silva, 1995). Esto permite conservar la calidad del suero durante más tiempo para su transporte o manipulación posterior (Siso, 1996). Este subproducto representa un problema para el medio ambiente debido a su alta demanda biológica de oxígeno (Park y Nam, 2015). Aproximadamente se obtienen 9 L de suero lácteo a partir de 1 kg de queso producido, resultando una demanda química de oxígeno (DQO) de alrededor de 50.000 a 80.000 mg/L y una demanda bioquímica de oxígeno de 40.000 a 60.000 mg/L (Capdevila et al., 2020; Lappa et al., 2019). La industria láctea de Argentina en el año 2008 destinó 4200 millones de litros de leche para la industria quesera, cifra equivalente al 42 % de su producción generando 3.800 millones de litros de suero de queso, el cual se utiliza para consumo animal, como materia prima para la industria y como fertilizante, tratándose como efluente únicamente el 1% de esta producción (González, 2012; Valencia y Ramírez, 2009). Estos usos del suero permiten reducir mínimamente los problemas económicos y medioambientales que supone como residuo (Bosso et al., 2020). Sin embargo, se reportan en bibliografía una gran cantidad de posibles usos biotecnológicos

del suero de queso en la actualidad, existiendo innumerables alternativas de procesamiento de complejidad tecnológica creciente (Ryan y Walsh, 2016).

La levadura *V. victoriae* es capaz de crecer usando lactosa (Kurtzman et al, 2011). En el grupo de investigación se ha demostrado por primera vez el uso de suero de queso como sustrato para la producción de biomasa de la levadura *V. victoriae* (Gorordo et al., 2022 y 2023).

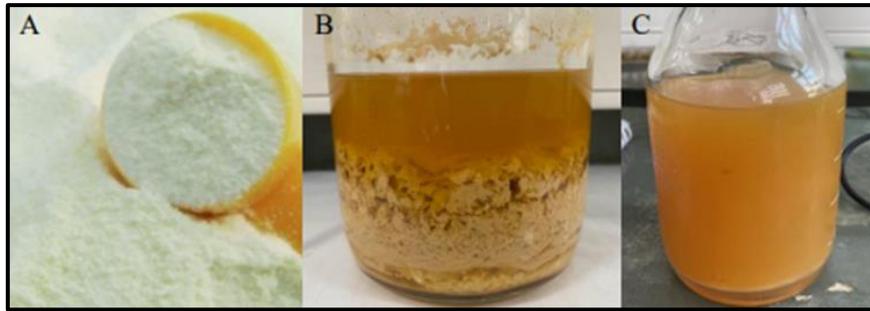


Figura 6: Suero de queso. (A) Suero de queso en polvo (SQP). (B) Suero de queso en polvo disuelto en agua y esterilizado. (C) Suero de queso en polvo diluido, estéril y filtrado.

6.2 Mosto de manzana

En Argentina, la producción de manzanas presenta históricamente una distribución de aproximadamente un 35% para consumo en fresco, 17% para exportación y el 48% restante se industrializa para la producción de mosto o jugo, fruta deshidratada y diferentes preparaciones. La fruta industrializada se considera fruta de descarte por su estado sanitario o por no cumplir con las condiciones de calibre para ser destinada al mercado internacional para su consumo en fresco (Carciofi, 2022). Los principales factores que afectan al descarte de manzanas son climáticos (helada, rameado, deformada, granizo), por sanidad (carpocapsa, psílido, erinosis, chinche, chaqueta amarilla, arañuela), de manejo (fertilización, madurez, tamaño) y en cosecha (golpes, heridas, pedúnculo, hojas, color)(Aguilar y Masi, 2020).

La industrialización de la manzana es una actividad complementaria de la cadena de producción, en donde la mayor parte del procesamiento corresponde a la producción de mosto de manzana, estimada en 17.000 toneladas en 2020 (Santagni et al., 2022). El jugo constituye una *commodity* de bajo valor agregado utilizado por ejemplo en producción de

sidra de manzana y se estima que la industria requiere aproximadamente 7 kg de manzana para obtener 1 kg de mosto de manzana (Carciofi, 2022). En el complejo de frutas de pepita, la mayoría de las industrias no contienen programas de reutilización de residuos, desconocen alternativas de valorización, y por lo general conceden los desperdicios a productores y agentes interesados en su reutilización.

El mosto de manzana obtenido a partir de la molienda y prensado de estas frutas, contiene numerosos compuestos, principalmente carbohidratos, vitaminas, minerales y aminoácidos, que son metabolizados o transformados químicamente por microorganismos (Gonzales Flores, 2018). La fructosa, la sacarosa y la glucosa son los principales carbohidratos presentes. El mosto es un sustrato económico y es considerado un subproducto de la industria frutícola (Anvari et al., 2014; Champagne et al., 1989). Existe muy poca bibliografía sobre el crecimiento de levaduras en mosto de manzana, sus características lo convierten en un sustrato apropiado para la producción de biomasa. El aprovechamiento de este desecho como medio de cultivo proporcionaría una opción viable para minimizar el daño ambiental ocasionado por el mismo y al mismo tiempo disminuir costos en la producción industrial del agente de control biológico (Gramisci, 2019; Bravo et al, 2019).

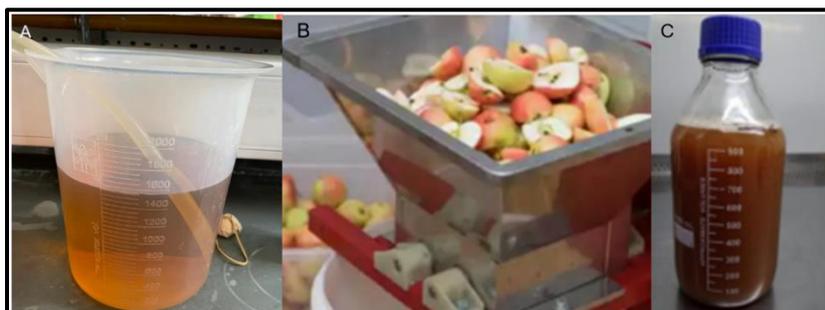


Figura 7: (A) Mosto de manzana como medio fresco. (B) Molienda de manzana. (C) Mosto de manzana estéril.

7. Ensayos a escala semicomercial

En los programas de desarrollo de ACB, se determina el éxito del microorganismo antagonista a través de experimentos y ensayos a escala semicomercial que involucran grandes cantidades de fruta y biomasa de levaduras del ACB. Los resultados de estos experimentos a gran escala realizados con biocontroladores seleccionados son escasos a nivel mundial (Alegre et al., 2013; Carvalho Castro et al., 2020; Chand-Goyal y Spotts,

1997; Droby et al., 1998; El-Ghaouth, Smilanick, Brown, et al., 2000; Gorordo et al., 2022; Govender et al., 2005; Janisiewicz y Jeffers, 1997; Lutz et al., 2020). Muchos estudios tienen una alta variabilidad e inconsistencia en los niveles de control de las enfermedades fúngicas (Mari, 2014; Nunes, 2012). Por lo tanto, actualmente no se puede utilizar como única estrategia para el manejo de enfermedades postcosecha y se integra a otros sistemas de control (Talibi et al., 2014). Existen varios factores que influyen en la variabilidad de los resultados, como el proceso de producción y formulación, el método de aplicación, la presión de inoculación, el estado fisiológico de la fruta y las estrategias de mejoramiento utilizadas (Freimoser et al., 2019). Además, el nivel de susceptibilidad del huésped, el tiempo transcurrido entre la infección y el tratamiento, y la posible presencia de infecciones latentes también pueden afectar los resultados (Sanzani et al., 2009).

Por lo tanto, la formulación sigue siendo una cuestión clave para los biocontroladores y su aplicabilidad en condiciones comerciales, junto con la compatibilidad con las prácticas habituales de procesamiento y almacenamiento de la fruta. Es importante integrar los biocontroladores con sustancias GRAS como sales de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, o inductores de resistencia, con el objetivo de generar efectos aditivos o sinérgicos entre diferentes estrategias de control (Gramisci et al., 2018; Zhimo et al., 2014). En las evaluaciones a escala semicomercial, se utilizan los sistemas de aplicación comúnmente utilizados para los fungicidas (Droby et al., 2016), como sistemas de tanque de inversión, pulverización o cortina de líquido (*drencher*). De estas alternativas, la menos recomendada son los tanques de inmersión, ya que incrementan los propágulos de patógenos en la solución a medida que ingresa la fruta, lo cual afecta la eficacia del biocontrol. Los más utilizados son aquellos que pulverizan o empapan la fruta en la línea de empaque. Se emplean boquillas tipo cono impulsadas hidráulicamente o por presión de aire para pulverizar el líquido sobre la fruta. Sin embargo, este tipo de boquillas reduce considerablemente la viabilidad del ACB debido a la presión generada para que puedan ser aplicados (Gorordo et al., 2022; Lutz et al., 2020). En los experimentos de eficacia de un ACB a escala semicomercial, se evalúa la incidencia natural con y sin la aplicación de ACB, luego de un determinado período de conservación de la fruta en cámaras frías de postcosecha. Estos ensayos son necesarios para el proceso de registro de los biocontroladores.

OBJETIVOS

Objetivo general

En este Proyecto Integrador Profesional se tiene como objetivo el crecimiento de *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263 con diferentes sustratos (SQP y MM) en cultivo semicontinuo. Para comprobar si las diferentes condiciones de crecimiento afectan la habilidad de la levadura para controlar el avance de las enfermedades postcosecha, se realizarán evaluaciones de la actividad antagonista de la levadura a escala semicomercial sobre peras y manzanas.

Estos ensayos de producción de biomasa en diferentes condiciones permitirán establecer una condición ideal para el desarrollo de la levadura antagonista de manera económica y compatible con la formulación industrial de las mismas. Lograr el objetivo general de esta propuesta contribuirá a mejorar las prácticas de la agroindustria de la fruta orgánica, aumentando las herramientas disponibles para la puesta en práctica de las normativas de calidad vigentes en el mundo.

Objetivos específicos

- Caracterizar los parámetros de producción de biomasa de *V. victoriae* en cultivo semicontinuo con los medios basados en suero de queso en polvo (SQP) y mosto de manzana (MM).
- Evaluar la actividad antagonista de *V. victoriae* crecida en las diferentes condiciones en ensayos a escala semicomercial en empaques de pera.
- Profundizar el manejo de técnicas de laboratorio y uso de equipamiento disponible.
- Analizar los resultados obtenidos y redacción de trabajo de Tesis.

MATERIALES Y METODOS

1 Equipamiento utilizado

- Agitadores magnéticos
- Aireadores de pecera
- Antiespumante
- Autoclave tipo Chamberland VZ 50 L
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Bomba peristáltica
- Cabina de flujo laminar
- Cámara de Neubauer
- Centrífuga refrigerada
- Chiller
- Espectrofotómetro Shimadzu 1603 UV-Vis de doble haz
- Estufa 37°C y de 105°C
- Filtro tangencial
- Freezer -20°C
- Heladeras con control de temperatura
- Material de vidrio (vasos de precipitado, frascos con tapa, etc.)
- Material descartable (tubos eppendorf de 2ml, tips, guantes de nitrilo, etc.)
- Material estéril (tubos de centrifuga para toma de muestra, tips)
- Microscopio Nikon Eclipse 80i
- PC con software para control y medición de temperatura, de oxígeno y espuma
- Pipetas automáticas (de 20, de 200, de 1000 y de 5000 µL)
- Placas de Petri
- Reactor *batch* de acero inoxidable (capacidad 15 L)
- Vortex

2 Medios de cultivo

2.1 Medio de cultivo sólido

GPY Agar: Extracto de levadura 5 g/L; Peptona 5 g/L; Glucosa 40 g/L; Agar 20 g/L. (Kurtzman et al., 2011).

2.2 Medios de cultivo líquido

Para la producción de *V. victoriae* se emplearon dos medios de cultivos previamente optimizados (Gorordo et al, 2020 y 2023) basados en residuos agroindustriales: SQP y MM.

2.2.1 Medio optimizado SQP

El SQP, marca Vacalin® sirvió como fuente de carbono, energía y otros elementos nutricionales para el crecimiento de la levadura. La mayor parte de este sustrato corresponde a lactosa (75% p/p) y proteínas (15% p/p). Se preparó una solución concentrada de suero de queso (20%) en agua destilada, luego se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C, para permitir la precipitación de la caseína, y después se filtró en condiciones asépticas. Se preparó por otro lado la solución concentrada estéril de los micronutrientes seleccionados. Finalmente, esta solución es incorporada hasta alcanzar las concentraciones definidas en la optimización del medio de cultivo. El medio de cultivo optimizado tuvo una composición final de: SQP 80 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,2 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L (Gorordo et al, 2023).

2.2.2 Medio optimizado MM

El MM fue obtenido de una sidrera de la ciudad de Allen, Río Negro (Saenz Briones y Cia S.A). La composición de este mosto fue de 143,23 g/L de azúcares reductores, 42,84 ppm de amonio total y 14,0 ppm de amonio libre. EL MM se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C y después se filtró en condiciones asépticas. El mosto fue diluido hasta alcanzar las concentraciones definidas en la optimización del medio para el crecimiento de la levadura. El medio de cultivo optimizado tuvo una composición final de: MM 44,4% v/v, urea 2 g/L, KH₂PO₄ 7,3 g/L (Gorordo et al, 2020).

3 Material biológico y vegetal

3.1. Microorganismo y preparación de inóculo

Se utilizó una cepa de levadura identificada como *V. victoriae* NPCC 1263 (*North Patagonian Culture Collection*, Neuquén, Argentina.) que fue aislada de la superficie de peras conservadas en cámara frigorífica y seleccionada por su capacidad de actuar como levadura antagonista para el control biológico de enfermedades postcosecha (Lutz et al., 2012). Esta levadura, junto con la levadura *Pichia membranifaciens* NPCC 1250 están patentadas para este uso: “*Cepas de levadura para el biocontrol de podredumbres en frutas durante la post cosecha, composiciones que las contienen, métodos de aplicación de las composiciones y usos.*” N° de presentación: 20120101053. Titulares: CONICET/Universidad Nacional del Comahue. La levadura *V. victoriae* se conservó en glicerol 20% v/v a -20°C en la Colección de Cultivos de la Patagonia Norte. Para su reactivación, se repicó la levadura en medio sólido GPY-Agar durante 48 h a 20°C, obteniéndose así un cultivo fresco de la levadura. Para cuantificar el número de células de levaduras para iniciar los cultivos, se realizó una suspensión en agua destilada y se cuantifica el número de células por mL en cámara de Neubauer.

3.2 Frutas de producción orgánica

Para la evaluación de la efectividad del ACB en ensayos a escala semicomercial se emplearon peras de los cultivares Beurré D’Anjou y Packham’s Triumph y manzanas del cultivar Red Delicious. Todas las frutas, de producción orgánica, fueron provistas por el empaque La Deliciosa S.A. ubicado en la ciudad de Centenario, provincia de Neuquén, quien también cedió sus instalaciones para los ensayos en línea y conservación en cámara fría en cada temporada (Convenio CONICET 8915-2014 y UNCo 876/00-2014). Los dos tipos de frutas fueron cosechados con madurez fisiológica y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95% de HR). En este proyecto integrador profesional, se tuvo en cuenta las consideraciones del galpón de donde provienen las frutas.

4. Métodos analíticos

4.1 Cuantificación del crecimiento de las levaduras

El crecimiento de las levaduras a lo largo del tiempo de cultivo se cuantificó por medición de densidad óptica en espectrofotómetro a 640 nm con cubeta de vidrio. La biomasa de los cultivos se determinó por peso seco a partir de 10 mL del cultivo, esta alícuota se lavó por centrifugación a 4068 x g con agua estéril y se secó en estufa a 105°C hasta peso constante. Para cuantificar el número de levaduras viables (UFC), se cuantificó inicialmente el número de células por mL en cámara de Neubauer, se realizaron diluciones en condiciones de esterilidad y se sembraron 100 µL de las suspensiones en agar GPY con espátula de Drigalsky esterilizada a la llama del mechero, para obtener un recuento de colonias entre 30 y 300 UFC al cabo de 48 h de almacenamiento a 20°C.

4.2 Cuantificación de azúcares

La cuantificación de azúcares reductores se realizó por el método colorimétrico DNS (Miller, 1959). Se añadieron 100 µL de DNS (Acido 3,5 dinitrosalicílico) a 100 µL de muestra, se incubó a 100°C durante 5 min y se detuvo la reacción con hielo. Se añadió 1mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm. Se utilizó un patrón de glucosa o lactosa de 5 g/L para la curva de calibración correspondiente. Para contrastar los resultados obtenidos por DNS, muestras iniciales y finales de los reactores semicontinuos (RSC) se analizaron mediante HPLC. Se utilizó una columna SHODEX SP810, la fase móvil fue agua destilada con un caudal de 0,6 mL/min y una temperatura de columna de 85°C. El detector utilizado fue un índice de refracción marca Konik Instruments.

4.3 Cuantificación de nitrógeno libre

La cuantificación del nitrógeno en forma de amonio presente en las muestras fue realizada por el kit comercial de medición Urea Color 2R de la marca Wiener Lab®. Se

añadió 2 mL de reactivo a 10 μ L de muestra, se incubó a 37°C durante 5 min y se detuvo la reacción con frío. Se midió la absorbancia a 570 nm. Se utilizó un estándar de urea 60 g/L para la determinación de amonio en las muestras. La cuantificación de nitrógeno fácilmente asimilable (FAN) se realizó por el método de Sørensen (Sørensen, 1908). Se agregan 10 mL de formol a 50 mL de muestra con pH=8. La solución es titulada con NaOH 0,1 N hasta alcanzar nuevamente pH=8.

4.4 Determinación de Proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas en el sobrenadante se realizó por el método descrito por Lowry et al., (1951). Se agregó 1 mL de reactivo a 10 μ L de muestra, luego de 10 minutos, se agregan 100 μ L de reactivo de Folling y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La concentración de proteína se determinó mediante una curva estándar de albúmina sérica bovina (Sigma). Se midió la absorbancia a 750 nm.

4.5 Determinación de parámetros cinéticos

El parámetro cinético A es el valor máximo de densidad óptica alcanzado: $\ln(DO_f/DO_i)$. Este se obtuvo a partir de los valores experimentales de densidad óptica inicial (DO_i) y densidad óptica final (DO_f). La velocidad específica de crecimiento máxima $\mu_{m\acute{a}x}$, se obtuvo a partir del cálculo de la pendiente de la curva $\ln(DO_t/DO_i)$ vs. Tiempo, en cada una de las etapas *batch* según la siguiente ecuación:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{X_2 - X_1}{Y_2 - Y_1} \quad (Ec. 1)$$

donde X_2 y X_1 son dos valores de abscisas de la recta correspondientes al tiempo, Y_1 y Y_2 son dos valores de ordenadas de la recta correspondientes a $\ln(DO_t/DO_i)$.

4.6 Determinación de parámetros de producción

La concentración final de biomasa (X), se obtuvo a partir de la determinación de peso seco de las levaduras en estufa a 105°C.

Durante el crecimiento celular existe, una relación lineal entre la cantidad de biomasa producida y la cantidad de sustrato consumido. Esta relación se expresa cuantitativamente mediante el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$). Este parámetro se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{g de biomasa producida}}{\text{g de sustrato consumido}} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{-(S_f - S_i)} \quad (\text{Ec. 2})$$

La concentración de células viables (UFC/mL), se obtuvo a partir del recuento en placa de petri sembraron 100 μ L de las suspensiones en agar GPY con espátula de Drigalsky esterilizada.

La productividad volumétrica (P_v) se determinó como la cantidad de biomasa en peso seco generada por unidad de volumen dentro del reactor en un tiempo determinado. Se determinó al final de cada reactor.

5 Producción de biomasa en reactor

Para lograr la cantidad necesaria de levaduras para los ensayos a escala comercial, se deben realizar varios cultivos *batch* sucesivos, esto demandaría mucho tiempo, además durante este período la biomasa pierde viabilidad y efectividad (Gorordo et al, 2022). Una propuesta para aumentar la producción de biomasa y reducir los tiempos de trabajo, es realizar cultivos semicontinuos.

La producción de biomasa a escala laboratorio se llevó a cabo utilizando un reactor de 15 L de capacidad máxima con un software de control (NovaScada) (Figura 7). El reactor está provisto de un sensor de oxígeno disuelto marca Hamilton®, sensor de temperatura PT100, 4 *baffles* verticales, sensor de espuma, serpentín interno para refrigeración, 3 bombas peristálticas que permiten la adición de antiespumante u otros líquidos, aireador tipo herradura con orificios de 1,5 mm y 3 paletas con 6 aletas planas (tipo Rushton) regulables. Cuenta con un motor superior de 0,15 CV de 220 VAC. Velocidad máxima 800 rpm y sello mecánico simple. El agua es refrigerada utilizando un equipo de enfriamiento (chiller) que mediante una bomba transporta el agua hacia el serpentín del reactor. El aire es provisto estéril por aireadores con filtros de 0,22 μm . Todas las fermentaciones se llevaron a cabo con un volumen de 12 L, a 20°C, 300 rpm y 0,64 vvm de aireación.

5.1 Reactor semicontinuo

Se realizaron cultivos en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo según el caso. Estos cultivos se empelaron como inóculo fresco (1×10^5 cel/mL), se creció hasta la mitad de la fase exponencial y en ese momento se incorporó a un Erlenmeyer de 2 L de capacidad con 900 mL del mismo medio cultivo. Cuando se llegó a mitad de la fase exponencial, se inoculó este cultivo en el reactor que contenía previamente 11 L del mismo medio de cultivo estéril. El cultivo inició como un reactor *batch* y una vez alcanzada la mitad de la fase exponencial, a las 48 h aproximadamente, el reactor se alimentó tres veces a intervalos de 24 h. Antes de cada alimentación, se retiraron 5 L del contenido del reactor y, a continuación, se añadieron 5 L del medio de cultivo fresco hasta alcanzar una

producción final de 27 L de volumen (Figura 9). El cultivo semicontinuo podría considerarse como una sucesión de 4 cultivos *batch*, por esto, en cada una de las etapas del RSC, se determinan los parámetros cinéticos y de producción. La productividad volumétrica (Pv) se determina para el proceso global de producción.



Figura 8: (A) Reactor escala de laboratorio con motor y equipo de refrigeración. (B) Parte interna del reactor, agitadores, serpentín y aireador. (C) Software de control.

6 Separación de levaduras del medio de cultivo por filtración tangencial

La biomasa obtenida en el reactor se concentró utilizando un filtro tangencial de 100 KDal de tamaño y 0,5 m² de superficie. El filtro se esterilizó previamente utilizando una solución de NaOH 0,5 N durante 30 min y luego con ADE para eliminar el NaOH durante 30 minutos. Durante el proceso de filtración, la biomasa concentrada se almacenó en un recipiente estéril hasta su uso y el sobrenadante se descartó.

El filtro cuenta con un manómetro de salida, cuya presión se ajustó mediante una válvula de ajuste. Mientras más cerrada se encuentra la válvula de ajuste, mayor será la presión transmembrana y mayor será la cantidad de permeado filtrado. La presión del manómetro de entrada es función de la velocidad de la bomba y de la resistencia que presente el filtro al paso del medio. Ésta inicialmente es aproximadamente cero y a medida que el filtro se vaya obstruyendo, ira aumentando. Se recomienda no exceder 1bar (0,1 MPa) de presión de entrada.

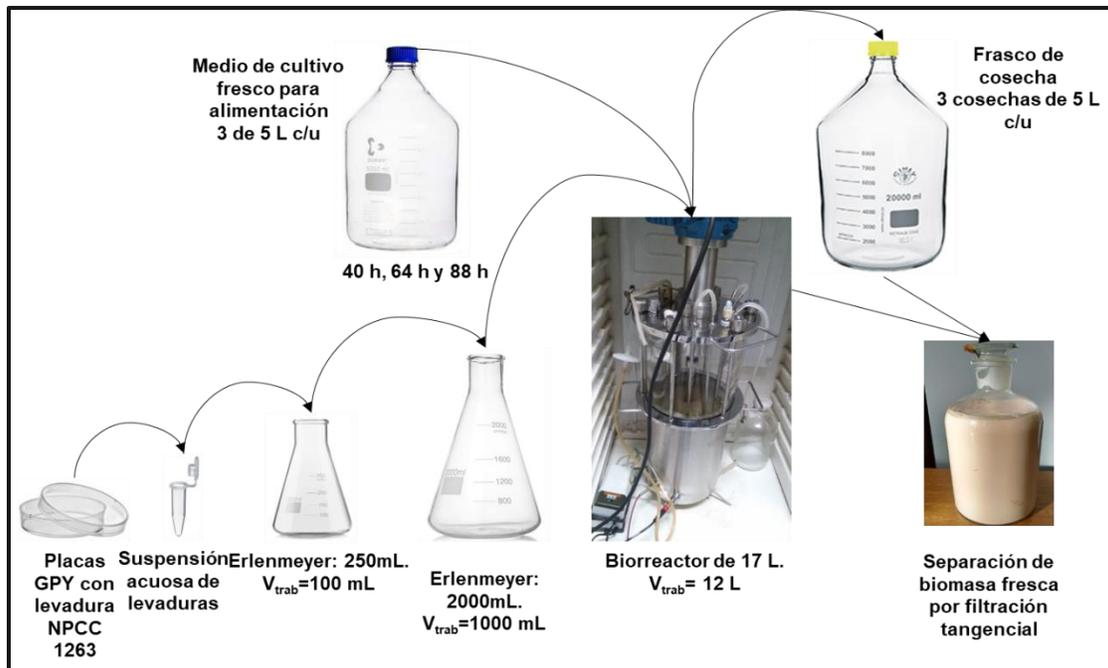


Figura 9: Esquema de producción de biomasa en reactor semicontinuo.

7 Ensayos en línea de empaque

La evaluación a escala semicomercial de las levaduras antagonistas producidas en el reactor semicontinuo se llevó a cabo en un empaque regional con manejo orgánico, incluyendo línea de procesamiento y cámaras de almacenamiento frigorífico (La Deliciosa S.A.). Este ensayo se realizó para evaluar la efectividad de *V. victoriae* como ACB en variedades de pera y manzana. Se evalúa también el acondicionamiento fisiológico y la capacidad antagónica de levaduras frescas crecidas en la configuración de producción de biomasa semicontinuo, además de comparar los medios de cultivos utilizados.

7.1 Aplicación de las levaduras antagonistas

La fruta ingresó a la línea de procesamiento en cajones bins con capacidad de 430-450 Kg (~1400 frutas por bins). Los cajones se sumergieron en el hidromersor que contenía una solución de hipoclorito de sodio (100 ppm), siguiendo la metodología habitual

de los empaques. Luego las levaduras se pulverizaron en el sector de aplicación de productos. La suspensión de cada tratamiento con levaduras se preparó con agua de red. Se utilizaron 25 L de preparación de levaduras conteniendo 10^8 UFC/mL. Las levaduras se aplicaron con el agregado de 2% p/v de CaCl_2 en dos tratamientos: biomasa producida en RSC con medio de cultivo basado en MM (TMM) y biomasa producida en RSC con medio de cultivo basado en SQP (TSQP).

Posteriormente al tratamiento con levaduras, la fruta se secó en un túnel constituido por un sistema de ventiladores, hasta llegar al sector de clasificación manual de la fruta. La fruta tratada y clasificada se almacenó en bandejas de cartón, dentro de bolsas plásticas y cajas de cartón, siguiendo las prácticas tradicionales del manejo postcosecha y se conservó en atmósfera convencional a $-1/0^\circ\text{C}$ - 95% HR (Figura 10). Las cajas obtenidas de los tratamientos (20-30), se almacenaron en pallets en las cámaras frías. Luego de 120 y 150 días se determinó el porcentaje de incidencia natural (Sección 7.4 Ec. 4) de *Alternaria-Cladosporium*, *P. expansum* y *B. cinerea*.

7.2 Efecto del sistema de aplicación sobre las levaduras

Se tomaron muestras de las suspensiones de las levaduras a la salida del sistema de aplicación utilizado durante el ensayo, para establecer el efecto del sistema de aplicación sobre el número de células aplicadas en cada tratamiento. Se determinaron las UFC/mL de cada tratamiento en GPY agar con el agregado de cloranfenicol (200 ppm), las placas se incubaron por 15 días a 4°C para favorecer en primer lugar el desarrollo de la levadura.

7.3 Capacidad de colonización de las levaduras sobre la superficie de fruta

Se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de la superficie de los frutos (dos frutos por cada tratamiento) antes del embalaje y cada un mes durante el período de conservación en frío. Para ello, se colocaron dos frutas en una bolsa con 100 mL de agua destilada estéril, se sometieron a agitación y fricción manual de superficie por 2 min. Se realizaron diluciones seriadas de las aguas de lavado (AL) y se realizó la siembra de alícuotas en GPY-agar con cloranfenicol (200 mg/L). Las placas se

incubaron a 4°C durante 15 días. Se determinó el número de UFC, y los resultados se expresaron como log UFC/cm² de fruto según el cálculo de superficie de los frutos evaluados (Babic et al., 2012).

El crecimiento en superficie (UFC/cm²) durante el periodo de almacenamiento (180 días) se ajustó al modelo de Gompertz propuesto por Zwietering et al., (1990):

$$y = A * \exp \left\{ - \exp \left[\left(\frac{(\mu_{m\acute{a}x} * e)}{A} \right) (l - t) + 1 \right] \right\} \quad (Ec. 3)$$

donde $\mu_{m\acute{a}x}$ es la velocidad específica de crecimiento máxima, A el valor máximo de densidad óptica alcanzado y l la duración de la fase de latencia. Siendo $\mu_{m\acute{a}x}$, A y l parámetros de ajuste del modelo.

$y = \ln(N_t/N_0)$, N_0 y N_t son la densidad óptica inicial y a tiempo t respectivamente. $A = \ln(N_\infty/N_0)$ es el máximo valor de densidad óptica alcanzado con N_∞ como asíntota máxima. Los datos correspondientes a cada experiencia fueron ajustados mediante una estimación no lineal minimizando la suma de las desviaciones al cuadrado de los valores observados de la variable dependiente respecto a los predichos por el modelo. Los cálculos fueron realizados utilizando el paquete estadístico STATISTICA 8.0.

7.4 Análisis estadísticos

La incidencia de la enfermedad causada por los dos patógenos estudiados en los ensayos se analizó utilizando un modelo lineal no generalizado de distribución binomial (GLM) a través del sistema de análisis estadístico (INFOSTAT, versión 2018e).

El parámetro de cuantificación del porcentaje de incidencia se estableció de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\%I = \frac{b}{x} * 100 \quad (Ec. 4)$$

Dónde: %I: porcentaje de incidencia, x: número de frutos inoculados, b: número de frutos inoculados y enfermos.



Figura 10: Etapas del procesamiento de la fruta tratada con las levaduras como agentes de control biológico.

RESULTADOS

1 Producción de biomasa en reactor semicontinuo

Se evaluó el sistema de configuración semicontinuo para producción de biomasa en el reactor de 15 L, con el objetivo de comparar luego los resultados obtenidos con dos medios de cultivo optimizados: Reactor con medio basado en suero de queso en polvo (RSQP) y Reactor con medio basado en mosto de manzana (RMM).

1.1 Medio de cultivo basado en SQP

La biomasa alcanzó la fase estacionaria luego de 119 h de cultivo y alcanzó un volumen de producción de 27 L. Se concentró la biomasa utilizando un filtro tangencial, obteniendo así 3,5 L. Tal biomasa se concentró durante seis días, proceso en el cual perdió el 90,2% de viabilidad. Se almacenó en heladera durante 28 días hasta su aplicación.

Se determinaron los parámetros cinéticos y de producción de biomasa del RSQP (Tabla 1). Por otro lado, el cultivo se inició con 66,06 g/L de azúcares y terminó con 40,44 g/L de azúcares en el RSQ. El consumo de nitrógeno fue de 0,34 g/L de nitrógeno en el tiempo inicial y de 0,007 g/L en el tiempo final observándose un mayor consumo en las últimas dos etapas de cultivo. El porcentaje de oxígeno disuelto alcanzó el 20 % al final del cultivo (Figura 11). La concentración de azúcares, amonio y oxígeno aumentan con cada recambio de medio de cultivo, mientras que la concentración de biomasa disminuye (Figura 11). La producción de biomasa promedio fue de 9,89 g/L.

Tabla 1. Parámetros cinéticos y de producción obtenidos en RSQ.

RSQ	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/ml	X (g/L)	Y _{x/s} (gX/gS)	Pv (g/L.h)
RB1	2,28	0,073	-			5,57	0,47	
RB2	3,22	0,061	5		7,9X10 ¹³	7,9	0,44	0,08
RB3	3,38	0,028	-	119		10,08	0,43	
RB4	3,94	0,023	-			12,45	0,48	

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DOf/DOi), DOf: densidad óptica final, DOi: densidad óptica; inicial X: concentración final de biomasa; Y_{x/s}: rendimiento de biomasa expresado como g de biomasa (peso seco) /g de sustrato consumido; Pv: productividad volumétrica; RBi: reactor i de cada etapa considerada como batch, con i=1,2,3 y 4.

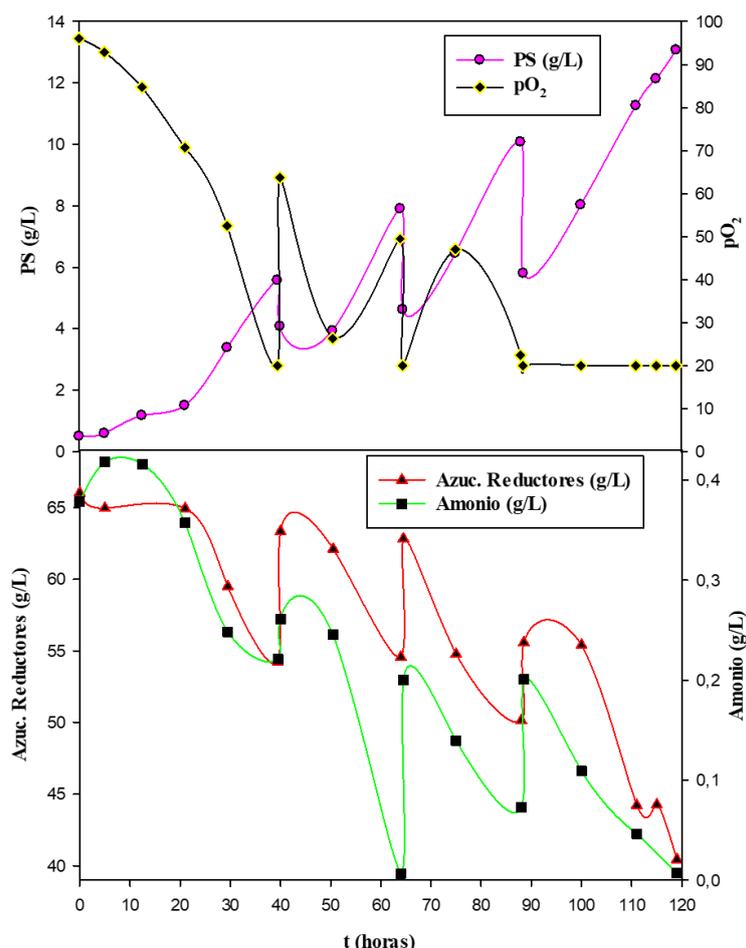


Figura 11: Producción de biomasa en RSQP semicontinuo de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco en medio optimizado. pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno. PS: peso seco (g/L).

1.2 Medio de cultivo basado en MM

La biomasa alcanzó la fase estacionaria luego de 142,5 h de cultivo y alcanzó un volumen de producción de 27 L. Se concentró la biomasa utilizando un filtro tangencial, obteniendo así 5,25 L. Finalizado el cultivo, la biomasa se concentró por medio del filtro tangencial durante cinco días, lo que generó una pérdida de viabilidad del 99%. La biomasa se conservó en heladera durante 25 días hasta su aplicación.

Se determinaron los parámetros cinéticos y de producción de biomasa del RMM (Tabla 2). El cultivo inició con 57,94 g/L de azúcares y terminó con 28,8 g/L de azúcares en el RMM. El consumo de nitrógeno fue de 1,28 g/L de nitrógeno en el tiempo inicial y de 0,63 g/L en el tiempo final observándose un mayor consumo en las últimas dos etapas de cultivo. El porcentaje de oxígeno disuelto alcanzó el 28,8 % al final del cultivo (Figura 12). La producción de biomasa promedio fue de 11,03 g /L.

Tabla 2. Parámetros cinéticos y de producción obtenidos en RMM.

RMM	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Lag (h)	t (h)	UFC/ml	X (g/L)	$Y_{X/S}$ (gX/gS)	Pv (g/L.h)
RB1	2,69	0,069	-			9,10	0,80	
RB2	2,77	0,037	5	142,5	$2,7 \times 10^{10}$	9,50	0,53	0,08
RB3	2,72	0,035	-			9,60	0,24	
RB4	2,96	0,039	-			13,05	0,47	

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: $\ln(\text{DO}_f/\text{DO}_i)$, DO_f : densidad óptica final, DO_i : densidad óptica; inicial X: concentración final de biomasa; $Y_{X/S}$: rendimiento de biomasa expresado como g de biomasa (peso seco) /g de sustrato consumido; Pv: productividad volumétrica; RBi: reactor i de cada etapa considerada como batch, con $i=1,2,3$ y 4.

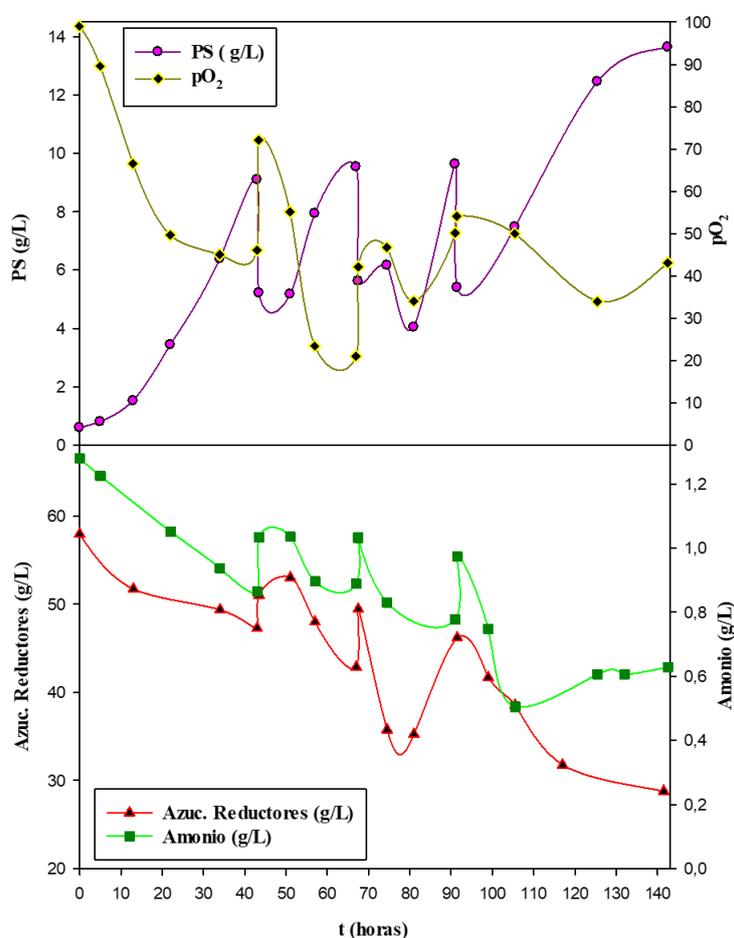


Figura 12: Producción de biomasa en RMM semicontinuo de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco en medio optimizado. pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno. PS: peso seco (g/L).

Las levaduras de *V. victoriae* son capaces de asimilar tanto glucosa como fructosa y utilizarlas aeróbicamente como fuente de carbono y energía (Figura 13). Se observa que la glucosa se consume en un 74,6%, mientras que la fructosa en un 38,8%. Por otro lado, el

100% de la sacarosa presente en el MM se desdobra para obtener los monosacáridos glucosa y fructosa; esto representa un consumo total de azúcares del 54,6%.

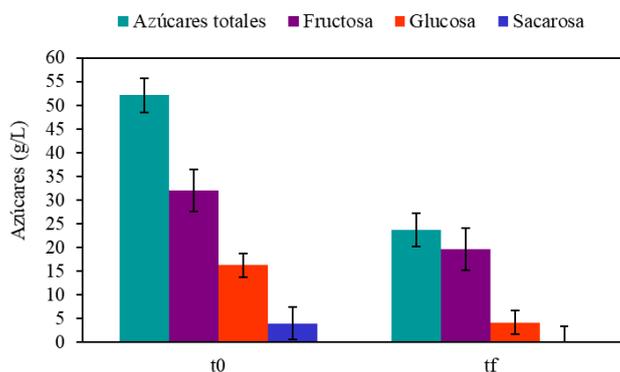


Figura 13: Consumo de azúcares de los cultivos de levaduras en RMM cuantificados por HPLC. t₀ tiempo inicial y t_f: tiempo final.

2 Ensayo en línea de empaque de producción orgánica

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de *V. victoriae* crecida en los medios de cultivo optimizados basados en MM y SQP se realizaron ensayos en línea de empaque en peras y manzanas en las condiciones habituales de procesamiento y almacenamiento de la fruta. Los ensayos fueron realizados sobre los varietales, Packham's Triumph y Beurre D' Anjou de pera y Red Delicious de manzana con el agregado de 2% de CaCl₂, en un empaque regional con manejo orgánico. Cada bins del varietal de pera Packham's Triumph contenía 1700-2400 frutas con una presión promedio de 12,8 lb y contenido de SS de 15%, mientras que cada bins de Beurré D'Anjou contenía 1800-2400 frutas con una presión de 12,4 lb y 14% de SS. Para el caso del varietal de manzana Red Delicious, cada bins contenía 2000-2200 frutas con una presión de 16,5 lb y 16% de SS. Los tratamientos se conservaron en cámaras frías durante seis meses respondiendo al manejo del empaque. Durante este periodo se evaluó la incidencia natural de enfermedades fúngicas.

La incidencia total de las podredumbres en el varietal Beurre D' Anjou en el tratamiento control (sólo agua) fue del 2,61% después de 100 días de almacenamiento en cámara frigorífica. El TMM redujo la incidencia total en 42,56%, controló un 80,53% a *P. expansum*, controló totalmente a *B. cinerea* y no logró controlar la incidencia causada por *Alternaria-Cladosporium spp* (Figura 14, A). El TSQP redujo la incidencia total en 45,62%, logro controlar la incidencia causada por *Alternaria-Cladosporium spp* en un 51%, controló un 42,90 % a *P. expansum* y controló un 41,60% a *B. cinerea* (Figura 14, A).

La incidencia total de las podredumbres en el varietal Beurre D'Anjou en el tratamiento control (sólo agua) fue del 7,06 % después de 150 días de almacenamiento en cámara frigorífica. El TMM redujo la incidencia total en 40%, logró controlar la incidencia causada por *Alternaria-Cladosporium spp* en un 35,14%, controló un 68,60% a *P. expansum* y controló totalmente a *B. cinerea*. El TSQP redujo la incidencia total en 43,70%, logro controlar la incidencia causada por *Alternaria-Cladosporium spp* en un 62.81%, controló un 65,33 % a *P. expansum* y controló un 54,13 % a *B. cinerea* (Figura 14, B).

La incidencia total de las podredumbres en el varietal Packham's Triumph en el tratamiento control (sólo agua) fue del 6,31% después de 150 días de almacenamiento en cámara frigorífica. El TMM redujo la incidencia total en 40,94 %, controló el 59,0 % de incidencia causada por *Alternaria-Cladosporium spp.*, sin embargo, no fue capaz de controlar a *B. cinerea* y tampoco *P. expansum* (Figura 14, C).

Por otro lado, la incidencia total de enfermedades en Red Delicious en el tratamiento control a los 100 días fue de 0,092% y a los 150 días fue de 0,37%. La incidencia total de las podredumbres en el varietal Red Delicious en el tratamiento control (sólo agua) fue del 0,87% después de 180 días de almacenamiento en cámara frigorífica. El TSQP redujo la incidencia total en 40,94 %, y tal tratamiento logró controlar a *B. cinerea* en un 57,23 %, *Alternaria-Cladosporium spp* en un 23,96 % y pudo controlar a *P. expansum* en un 67,92 % (Figura 14, D).

2.1 Aplicación y colonización de la superficie de la fruta de la levadura

Para evaluar si el sistema de aplicación de las levaduras a través de los orificios pulverizadores podría tener algún efecto sobre el número total de células viables, se tomaron muestras de la suspensión de los tratamientos con levaduras a la entrada y a la salida de los tubos de PVC perforados (Tabla 3). La cantidad inicial de UFC aplicadas en cada tratamiento en la línea de empaque se mantuvo constante a la salida de la pulverización en cada tratamiento, con respecto al número inicial en el agua de tanque. No hubo una reducción de la viabilidad (Tabla 3).

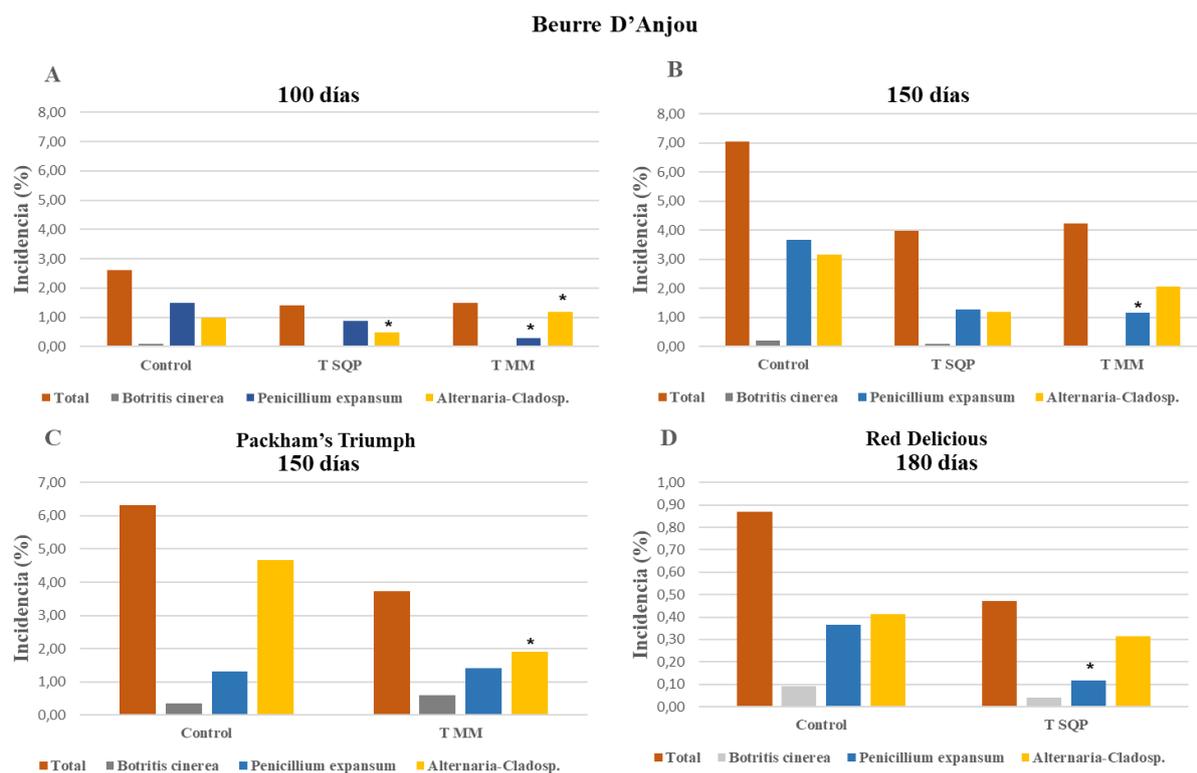


Figura 14: Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total tras 100 días (A), 150 días (B y C) y 180 días (D) de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Beurre D'Anjou (A y B), Packham's Triumph (C) y Red Delicious (D). Enfermedades evaluadas: Incidencia total, *P. expansum*, *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium sp.* Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%).

Luego de la aplicación de las levaduras sobre las frutas, se determinó el número UFC en la superficie de las frutas en el tiempo inicial y durante los 180 días de conservación en cámara fría (Figura 15). Sobre el varietal Beurre D'Anjou se observó que el TSQP muestra un crecimiento exponencial durante los 30 y 70 días de almacenamiento, luego comienza a desacelerar el crecimiento exponencial y por ende la concentración de UFC/cm^2 hasta alcanzar finalmente un valor constante (fase estacionaria). Por otro lado, el TMM muestra un crecimiento exponencial entre los 30 y 60 días de almacenamiento, luego concentración de UFC/cm^2 disminuyó paulatinamente hasta alcanzar el estado estacionario. El TMM muestra un valor máximo de $2,23 \times 10^3 \text{ UFC}/\text{cm}^2$, y el tratamiento TSQP muestra un valor máximo de $3,6 \times 10^3 \text{ UFC}/\text{cm}^2$.

Sobre el varietal Packham's Triumph se observa que las levaduras aplicadas en el tratamiento TMM muestran fase *lag* extendida hasta los primeros 60 días aproximadamente, luego un crecimiento exponencial entre los 60 y 110 días de almacenamiento. En los días de almacenamiento restantes, la concentración de UFC/cm^2 disminuyó paulatinamente hasta

alcanzar un valor constante, es decir se estaciona. El TMM muestra un valor máximo de $2,3 \times 10^3$ UFC/cm².

Sobre el varietal de manzana Red Delicious, ocurre algo similar. Las levaduras aplicadas en el TSQP muestran una fase *lag* hasta los primeros 30 días aproximadamente, luego un crecimiento exponencial entre los 60 y 150 días de almacenamiento. En los días de almacenamiento restantes, la concentración de UFC/cm² disminuyó paulatinamente hasta alcanzar el estado estacionario. El TSQP muestra un valor máximo de $7,53 \times 10^2$ UFC/cm² a los 150 días de almacenamiento. Estos resultados tienen una correlación con los datos de control de las enfermedades.

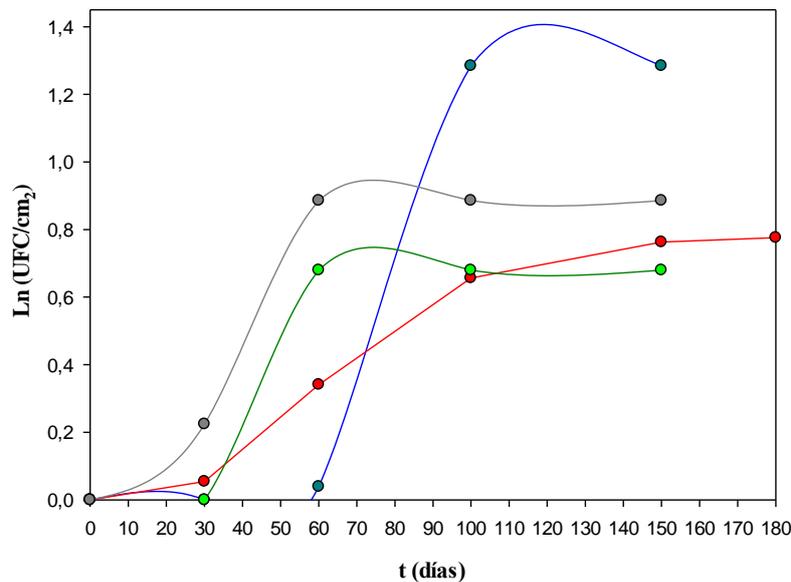


Figura 15: Crecimiento sobre la superficie de la fruta (UFC/cm²) durante el período de conservación en cámara frigorífica: Varietal Beurre D'Anjou TMM (■) Varietal Beurre D'Anjou TSQP (●). Varietal Packham's Triumph TMM: (■), Varietal Red Delicious TSQP (■). Las curvas fueron modeladas por el modelo de Gompertz

Tabla 3: Concentración de *V. victoricae* en el tanque y a la salida del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial.

Tratamiento	Beurrè D'Anjou		Packham's Triumph		Red Delicious	
	Tanque (UFC/mL)	Salida (UFC/mL)	Tanque (UFC/mL)	Salida (UFC/mL)	Tanque (UFC/mL)	Salida (UFC/mL)
TSQP	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	-	-	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
TMM	$4,0 \times 10^4$	$3,95 \times 10^5$	$9,90 \times 10^5$	$2,54 \times 10^6$	-	-

DISCUSIÓN

El control biológico en postcosecha ofrece una alternativa sostenible y prometedora para reducir la dependencia de los fungicidas químicos y controlar patógenos de postcosecha. El desarrollo de resistencia de los patógenos a los fungicidas químicos, además de las consideraciones ambientales y de salud, son algunas de las razones que impulsan el desarrollo de tecnologías de manejo de las enfermedades que sean alternativas, seguras y efectivas (Droby et al., 2016; He et al., 2024; Teixidó et al., 2022).

El control biológico de las enfermedades de frutas en postcosecha constituye un desafío único y de crecimiento constante. El ambiente controlado en temperatura y humedad de las cámaras de conservación de frutas ayuda a modificar el equilibrio en las interacciones entre el hospedante, el patógeno y el antagonista a favor de este último. Los ACB presentan claras ventajas, ya que son más seguros que los fungicidas de síntesis para su uso en alimentos, son capaces de persistir y crecer sobre la superficie de la fruta por largos periodos de tiempo, producen un efecto insignificante en el equilibrio ecológico, ya que no destruyen a los enemigos naturales, y son compatibles con otras medidas de manejo (Carvalho Pássaro et al., 2012; Ezzougari et al., 2024; Teixidó et al., 2022). De acuerdo a esto, las levaduras son un grupo versátil de microorganismos eucariotas que exhiben perfiles nutricionales heterogéneos y una sorprendente capacidad de sobrevivir en una amplia gama de hábitats naturales y artificiales (Shivaji y Prasad, 2009; Starmer y Lachance, 2011; Buzzini et al., 2012). Estas características hacen que sean herramientas biotecnológicas con un elevado potencial para distintos fines. Como ACB de las enfermedades de postcosecha las levaduras tienen ventajas sobre otros microorganismos, ya que son la comunidad más abundante cuando los frutos están maduros y están más adaptadas a las bajas temperaturas que las bacterias. (Buzzini y Margesin, 2014; Ferreira et al., 2023; Hu et al., 2015; Luo et al., 2019; Margesin, 2009).

En esta Tesis se trabajó con dos medios de cultivo. A partir de que se optimizaron dos medios de cultivo (SQP y MM) y se encontró que la biomasa crecía de forma favorable en tales medios (Gorordo et al., 2022, 2023), se tomaron como base para llevar a cabo la producción de biomasa en RSC y evaluar la capacidad de la levadura *V. victoriae* para combatir enfermedades postcosecha en peras y manzanas.

1 Comparación de la producción de biomasa con los dos medios de cultivo utilizados

En los últimos años se ha incrementado el uso de residuos de distintas industrias alimenticias, ya que son materia prima renovable, abundante y económica, pudiendo utilizarse como sustrato para la producción de biomasa de distintos microorganismos a escala industrial (Bosso et al., 2020; Zhihui et al., 2008). Desde hace muchos años la melaza, un subproducto de la industria azucarera, es utilizada como fuente económica de carbohidratos para la propagación de cepas de levaduras en diversas aplicaciones industriales debido a su composición rica en azúcares y nutrientes (Pérez-Torrado et al., 2015). Sin embargo, su composición es muy variable, ya que depende de la variedad de caña de azúcar, el suelo, el clima, el período de cosecha del cultivo, la eficiencia de la operación de la fábrica, el sistema a de obtención y en ocasiones puede presentar sustancias tóxicas para el crecimiento de las levaduras (Gómez-Pastor et al., 2011). Buscando otras alternativas de residuos agroindustriales, en esta Tesis se trabajó con dos medios previamente optimizados (Gorordo et al., 2022, 2023), mediante diseños estadísticos experimentales basados en dos residuos: SQP y MM.

La producción de biomasa en el RSQP alcanzó mejores resultados que el RMM en cuanto a UFC totales, aunque con el RMM se obtuvo mayor cantidad biomasa (peso seco). En cuanto a productividad volumétrica, se obtuvo el mismo valor para ambos casos (Tabla 4). En ambos cultivos, se observa una corta fase *lag* al inicio del cultivo, mientras que en los sucesivos recambios de medio de cultivo no se observa fase *lag*, ya que las levaduras están adaptadas al medio de cultivo (Figura 11, Figura 12). La concentración de azúcares, amonio y oxígeno aumentan con cada recambio de medio de cultivo, mientras que la concentración de biomasa disminuye. Esto genera que la velocidad específica de crecimiento disminuya a medida que avanza el cultivo, si bien las células que permanecen en el reactor están en crecimiento exponencial cuando se adiciona medio de cultivo, tienen una capacidad de metabolizar los sustratos adicionados y por lo tanto una velocidad de duplicación menor (Tabla 5).

Con respecto al tiempo de cultivo, el RMM tiene mayor duración, sin embargo, la producción de biomasa en este, resulta ser superior a la alcanzada en RSQP. Esto puede explicarse desde los valores del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}), el cual se determinó previamente para cada uno de los medios de cultivo: MM y SQP (Gorordo et al., 2022, 2023). El RMM tiene una k_{LA} mayor que el RSQP (Tabla 4), es decir la

transferencia de oxígeno es mejor. Una mayor transferencia de oxígeno hace que las levaduras tengan más oxígeno disponible para metabolizar y consumir azúcares, y por lo tanto para crecer.

Tabla 4: Comparación de producción de biomasa en RSC: RSQP y RMM

	RSQP	RMM
Volumen (L)	27	27
t cultivo (h)	119	142,50
DO _{max}	36,60	44,80
Biomasa total (g)	267,15	297,75
Biomasa (g/L)	9,89	11,03
UFC total	9,40x10 ¹⁷	2,98x10 ¹⁴
UFC/mL	7,87x10 ¹³	2,72x10 ¹⁰
Pv (g/L.h)	0,08	0,08
Consumo azúcar (g/L)	23,42	29,14
Consumo amonio (g/L)	0,30	0,59
Y _{x/s}	(*)	(*)
μ _{máx} (h ⁻¹)	(*)	(*)
k _{La} (h ⁻¹)	23,70	30,72

(*) Ver datos de la **Tabla 5** para cada una de las etapas de los RSC analizados.

Tabla 5: Rendimientos (Y_{x/s}) y μ_{máx} en cada una de las etapas de los reactores semicontinuos.

	RSQP		RMM	
	Y _{x/s}	μ _{máx} (h ⁻¹)	Y _{x/s}	μ _{máx} (h ⁻¹)
RB1	0,47	0,073	0,80	0,069
RB2	0,44	0,061	0,53	0,037
RB3	0,43	0,028	0,24	0,035
RB4	0,56	0,023	0,47	0,029

2 Proceso *downstream*

El procesamiento posterior (*downstream*) para la recuperación del producto útil luego de la producción de biomasa, se centra en la obtención de células, en nuestro caso el ACB. Dichos procesos incluyen principalmente la filtración y la centrifugación o, en algunos casos, la floculación (Teixidó et al., 2022). Muchas veces, las operaciones que son factibles y eficientes a pequeña escala en el laboratorio pueden volverse costosas o poco prácticas cuando se intentan implementar a gran escala en un entorno industrial. Sin embargo, al igual que ocurre con la producción de biomasa a nivel de reactor, las técnicas aplicadas industrialmente para el procesamiento posterior se desarrollan y prueban primero utilizando aparatos a pequeña escala (Doran, 2013). Cuando el agua es el principal componente de los

medios de cultivo, la purificación a partir de soluciones diluidas implica varios pasos de recuperación y costos más elevados que cuando el producto está disponible en una forma concentrada. Los caldos de fermentación cosechados son susceptibles de contaminación cuando el medio de cultivo que contiene las células se retira del entorno controlado del reactor, por lo tanto, el procesamiento posterior se debe realizar rápidamente y sin demoras (Doran, 2013).

En este trabajo integrador profesional se utilizó la filtración tangencial como metodología para concentrar el ACB. En el caso de la biomasa crecida en medio optimizado con SQP, el porcentaje de pérdida fue de 90%, disminuyendo en un orden de magnitud la concentración celular. Para la biomasa crecida en medio optimizado con MM la pérdida de viabilidad fue del 99%. Esta pérdida de viabilidad puede explicarse al hecho que las levaduras se encuentran sometidas a una gran variedad de factores estresantes durante el proceso *downstream*, lo que puede afectar su viabilidad y eficacia (Macarisin et al., 2010; Sui et al., 2015). Esto puede afectar negativamente a las propiedades del ACB, sin embargo, no se han evaluado en bibliografía los efectos que tienen las tecnologías aplicadas al procesamiento posterior a pequeña y gran escala de agentes de biocontrol (Wisniewski et al., 2010).

3 Evaluación de la capacidad antagónica de *V. victoriae* en ensayos a escala comercial

La producción de biomasa a gran escala es un paso crucial cuando se busca aplicar ACB a nivel comercial. En estos ensayos se debe comprobar que el ACB sea capaz de sobrevivir al paso por la línea de procesamiento y túneles de secado, así como también ser capaz de crecer sobre la superficie de la fruta durante el período de almacenamiento (Di Canito et al., 2021; Torres et al., 2014). Por esto, es necesario comprobar tanto su eficacia en ensayos a escala semicomercial, como también considerar todos los factores intervinientes en el sistema (Nunes, 2012). Para la realización de este trabajo integrador profesional, se llevó a cabo la producción de *V. victoriae* a escala laboratorio en RSC utilizando dos medios de cultivo optimizados. La biomasa de *V. victoriae* obtenida en los reactores fue evaluada a escala semicomercial. Se evaluó la incidencia natural de las enfermedades naturales causadas por *P. expansum*, *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium spp.*, sobre dos variedades de pera (Packham's Triumph y Beurré D'Anjou) y uno de manzana (Red Delicious). Los porcentajes de control obtenidos a nivel semicomercial en línea de empaque de producción orgánica, son

similares a los reportados por Lutz (2015) y Gramisci (2019) con la misma cepa de *V. victoriae* crecida en otros medios de cultivo, superando el 24% y en algunos casos 100% de control.

Los ensayos mostraron que las peras fueron más susceptibles a las podredumbres en comparación con las manzanas. Esto podría explicarse con las investigaciones (Gramisci, 2019; Lutz et al., 2017; Manso y Nunes, 2011; Torres et al., 2006) que proporcionan consistencia a la idea de que ciertos varietales de peras son más susceptibles a las enfermedades causadas por fitopatógenos en comparación con los varietales de manzanas. Esto refuerza la importancia de comprender las diferencias entre variedades de frutas en términos de resistencia a enfermedades, lo que puede ayudar a los agricultores y científicos a desarrollar estrategias más efectivas de manejo de enfermedades en cultivos de peras y manzanas. Uno de los enfoques básicos para el uso de ACB en el control de las enfermedades postcosecha es la utilización de microorganismos que ya existen en la fruta, antagonistas microbianos naturales (Siddiqui, 2015). A pesar de esto, ya que el ACB fue aislado y seleccionado para peras, se alcanzaron buenos porcentajes de control en manzana.

Independientemente del varietal analizado, cuando la levadura creció en medio de cultivo con SQP, se alcanzaron los porcentajes de control sobre *P. expansum* (43-68%), *Alternaria-Cladosporium* spp. (24-63%) mientras que para *B. cinerea* estuvo entre 42-57%. Cuando la levadura aplicada creció en medio de cultivo con MM, el porcentaje de control alcanzado sobre *P. expansum* fue del 68% únicamente sobre el varietal D Anjou. El porcentaje de control alcanzado para *Alternaria-Cladosporium* spp. fue de 35-59% en ambos varietales de pera, mientras que el porcentaje de control para *B. cinerea* fue de 100% en D Anjou.

En los varietales de pera, la incidencia de las enfermedades fue mayor sobre Packham's Triumph. Esto podría explicarse, ya que el contenido de sólidos solubles fue mayor en este varietal, frutas con índices de madurez más avanzados tienen menor potencial de conservación. El avance de la madurez y la incidencia de enfermedades se agravan y determinan un deterioro en postcosecha.

Considerando que el ACB fue aislado por su capacidad biocontroladora sobre *B. cinerea* y *P. expansum* en peras, es importante destacar que el control sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. resultó ser muy bueno, con porcentajes que alcanzaron el 60% aproximadamente en algunos casos. Existen pocos estudios sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. en particular que afecta a peras y manzanas y que ha incrementado su incidencia en los últimos años en la región del AVRNYN (Lutz et al., 2017).

Con respecto al sistema de aplicación, Droby (2006) asegura que este es un factor importante en el rendimiento final de los ACB, indicando que los sistemas de pulverización en línea son los más adecuados, sin embargo, existe poca bibliografía sobre el efecto de las boquillas de pulverización sobre los ACB (Lutz et al., 2020). El sistema de aplicación utilizado es un tubo de PVC perforado (Figura 16). Tal sistema, disminuye la presión ejercida en las boquillas, permitiendo que las células pasen a través de los orificios gracias a la fuerza de gravedad. Los resultados obtenidos en este proyecto integrador profesional muestran que el sistema de aplicación utilizado durante el ensayo en línea no disminuye significativamente la viabilidad de las levaduras cuando se compara con los datos previos empleando boquillas de aspersión.



Figura 16: Sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de las levaduras *V. victoriae*.

Un requerimiento importante para que un microorganismo sea un buen ACB es que sea capaz de colonizar las heridas presentes en la fruta. Los mejores antagonistas son capaces de colonizar el sitio de herida rápidamente, debido a que son metabólicamente activos a las bajas temperaturas en que se realiza el almacenamiento de los frutos (Janisiewicz y Korsten, 2002; Li et al., 2016; Vero et al., 2013). La cepa de levadura seleccionada *V. victoriae* NPCC 1263 tiene la característica particular de haber sido aislada de la superficie de pera en conservación, desde heridas que se mantuvieron sanas a pesar de la presencia de conidios de hongos en el ambiente. La selección de una cepa de levadura que ha sido aislada específicamente de la superficie de una fruta en condiciones de conservación frigorífica es una estrategia inteligente y prometedora, por lo cual su metabolismo está adaptado al sustrato y a las bajas temperaturas presentes en las cámaras de conservación frigoríficas (Lutz et al., 2013). Sin embargo, en este proyecto integrador profesional fue necesario evaluar la

capacidad de colonización de esta cepa de levadura antagonista en la condición de cultivo utilizada para la producción de biomasa. Este paso es fundamental para comprender cómo el acondicionamiento fisiológico puede afectar el comportamiento y la eficacia de la levadura como ACB. Los resultados de los ensayos en superficie de peras muestran que las levaduras desarrolladas en diferentes condiciones de cultivo presentan una población similar hasta los 30 días de realizado el ensayo, es decir, una fase de adaptación (fase *lag*) seguida de un crecimiento exponencial entre los 30 y 90 días de conservación, alcanzando la fase estacionaria luego de este tiempo hasta el final del período de conservación, aumentando la concentración de UFC/cm² en dos órdenes de magnitud con respecto a la concentración inicial al momento del ensayo (Figura 15). En el caso del varietal de manzana Red Delicious, el TSQP presentó un buen antagonismo para los tres variedades analizadas. Esto podría deberse a que la concentración de levaduras sobre la superficie de la fruta durante la segunda mitad del período de almacenamiento se mantuvo constante, lo que demuestra que una concentración de $1,69 \times 10^3$ UFC/cm² es suficiente para controlar la incidencia de las enfermedades.

Con respecto al medio de cultivo, *V. victoriae* crecida en la condición SQP logró una población al final del ensayo ligeramente superior a la lograda por la misma levadura crecida en el medio MM. Ambas condiciones de cultivo lograron aumentar un orden de magnitud durante su crecimiento en superficie (SQP: $3,51 \times 10^2$ UFC/cm² a $1,13 \times 10^3$ UFC/cm² y MM: $5,64 \times 10^2$ UFC/cm² a $2,23 \times 10^3$ UFC/cm²) a 180 días de conservación en frío. Estos resultados coinciden con los valores obtenidos en ensayos en superficie de peras previos realizados en este equipo de investigación, en donde los valores iniciales se encuentran en el orden de 10^2 UFC/cm² (Gramisci, 2019; Lutz, 2015). Lutz (2020) reporta que *V. victoriae* tuvo la mayor capacidad de establecimiento y colonización sobre la superficie de los dos variedades de peras a partir de los tres meses, manteniéndose constante la población viable luego de cinco meses de conservación.

De acuerdo a la bibliografía, solo se encuentran reportes en ensayos *in situ* en heridas provocadas, en tiempos cortos y en condiciones distintas a las comerciales (Hu et al., 2015; Liu et al., 2011; Zhang et al., 2013). A diferencia de los estudios antes mencionados, los ensayos de colonización de este proyecto integrador se realizaron en condiciones de almacenamiento comercial, es decir 0°C y 95% HR, durante 150-180 días, por lo tanto, son mucho más representativos de las condiciones de conservación de frutas en postcosecha.

El uso de Agentes de Control Biológico (ACB) es, sin duda, una estrategia prometedora para el control de enfermedades fúngicas en la producción de fruta orgánica. Estos agentes

pueden ofrecer varias ventajas significativas. En primer lugar, son respetuosos con el medio ambiente, ya que no introducen compuestos químicos sintéticos al ecosistema agrícola. Además, al ser selectivos en su acción, los ACB tienden a tener un impacto mínimo en la microbiota natural del suelo y en los organismos no objetivo, lo que contribuye a la biodiversidad y la salud del ecosistema agrícola.

Es importante destacar que el éxito del uso de ACB depende de varios factores, como la selección adecuada del agente biológico, las condiciones ambientales y de cultivo, y las prácticas agrícolas adecuadas. Sin embargo, cuando se implementan de manera efectiva, los ACB pueden ser una herramienta valiosa para el control de enfermedades fúngicas en la producción de fruta orgánica, contribuyendo a la sostenibilidad y la salud tanto del medio ambiente como de los consumidores.

CONCLUSIONES

- El uso de residuos agroindustriales para la producción de biomasa de levadura no solo es una práctica económica y sostenible, sino que también contribuye a una economía circular y permite producir grandes cantidades de biomasa. El MM presenta ventajas con respecto al SQP, dado que es un sustrato fácilmente accesible a nivel regional.
- La levadura es capaz de crecer en reactor a escala laboratorio en RSC en medio optimizado, obteniendo $7,87 \times 10^{13}$ UFC/ml con SQP y $2,72 \times 10^{10}$ UFC/ml con MM para ser aplicadas en ensayos a escala semicomercial sobre frutas postcosecha.
- La producción en RSC presenta la ventaja que reduce los tiempos y costos que conlleva producir más de un cultivo *batch*.
- En cuanto a productividad volumétrica (P_v) se obtiene el mismo valor utilizando cualquiera de los dos medios de cultivo (MM y SQP).
- En cuanto a rendimiento ($Y_{X/S}$), en las primeras dos etapas en RMM (etapas *batch*) se obtienen mejores resultados que en RSQP. Sin embargo, en las últimas dos etapas sucede lo contrario.
- En cuanto a velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$), en las primeras dos etapas en RMM se obtienen velocidades más bajas que en RSQP. Ocurre lo contrario en las últimas dos etapas cuando el medio es MM.
- El consumo de azúcares y amonio es mayor en RMM en comparación con RSQP.
- Se obtuvo mayor concentración de células viables en el RSQP, obteniéndose 3 órdenes de magnitud más en comparación con el RMM.
- En cuanto a k_{La} se obtiene un valor más alto cuando el medio es MM, lo que explica una mayor producción de biomasa (peso seco) en RMM.
- Teniendo en cuenta que la biomasa y las UFC son igual de importantes a la hora de comparar la producción de biomasa, la producción es buena en cualquiera de los dos medios analizados y se consigue la cantidad necesaria para llevar a cabo los ensayos en línea.
- El proceso *dowstream* afecta la viabilidad de las levaduras. Cuando crecen en RSC, la pérdida de viabilidad es grande independientemente del medio de cultivo utilizado, obteniendo en promedio $94,6 \pm 6,2$ %. En ensayos a escala semicomercial, las levaduras controlaron entre el 50-100% a las principales enfermedades postcosecha, demostrando que se adaptan a la tecnología de aplicación utilizada en los empaques regionales y que son capaces de crecer sobre la superficie del fruto (pera y manzana)

durante el período de almacenamiento, logrando controlar las enfermedades durante 3-6 meses de conservación.

Perspectivas futuras

- 🍏 Para maximizar el rendimiento, la eficacia y la vida útil del producto biofungicida, se debería optimizar mediante DEE (diseño estadístico experimental) la formulación del ACB.
- 🍏 Evaluar la capacidad antagonista de la levadura contra hongos fitopatógenos en diferentes cultivos de la región, como membrillo, durazno, cerezas, entre otros.
- 🍏 Con el objetivo de lograr un escalado con mayores volúmenes, se deberá evaluar la factibilidad técnica, económica y comercial del producto para determinar si su transferencia es viable y beneficiosa.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, L., y Masi, S. D. (2020). *Caracterización de pérdidas de calidad en la producción de pera y manzana de fruticultores familiares del Alto Valle del Río Negro* (p. 5). <https://intainforma.inta.gob.ar/secciones/agroindustria/>
- Ahrendts, M. R. B., y Carrillo, L. (2004). Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. *Revista Argentina de Microbiología*, 36, 182-186.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Altisent, R., y Abadias, M. (2013). Antagonistic effect of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against foodborne pathogens in fresh-cut apples under simulated commercial conditions. *Food Microbiology*, 33(2), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.007>
- Amiri, A., y Bompeix, G. (2005). Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: Consequences for decay development. *Plant Pathology*, 54(1), 74-81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01112.x>
- Anvari, M., Khayati, G., y Rostami, S. (2014). Optimisation of medium composition for probiotic biomass production using response surface methodology. *Journal of Dairy Research*, 81(1), 59-64. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000733>
- Armando, M. R., Galvagno, M. A., Dogi, C. A., Cerrutti, P., Dalcero, A. M., y Cavaglieri, L. R. (2013). Statistical optimization of culture conditions for biomass production of probiotic gut-borne *Saccharomyces cerevisiae* strain able to reduce fumonisin B 1. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1338-1346. <https://doi.org/10.1111/jam.12144>
- Babic, L., Matic-Kekic, S., Dedovic, N., Babic, M., y Pavkov, I. (2012). Surface Area and Volume Modeling of the Williams Pear (*Pyrus Communis*). *International Journal of Food Properties*, 15(4), 880-890. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.506020>
- Bai, Z., Jin, B., Li, Y., Chen, J., y Li, Z. (2008). Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 353-358. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60055-8)
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables—1st Edition* | Elsevier Shop. <https://shop.elsevier.com/books/postharvest-diseases-of-fruits-and-vegetables/barkai-golan/978-0-444-50584-2>
- Barrios López, J. C. (2022). *Estado de situación Enero 2023* (p. 9). *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sagyp-pera_y_manzana_situacion_2023_01.pdf
- Bautista-Baños, S. (2006). *El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: Uso de microorganismos antagonicos*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8, 1-6.
- Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre, J. R., y Colmenarez, Y. C. (2014). *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe* [Info:ar-repo/semantics/libro]. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/13103>
- Bosso, A., Bosso Tomal, A. A., Caldeirão, L., Da Silva, J. B., y Suguimoto, H. H. (2020). Cheese whey as potential medium fermentation to *Saccharomyces fragilis* IZ 275 yeast. *Scientia Plena*, 16(2). <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.020204>
- Bravo, S. M. E., Morales, M., Del Mónaco, S. M., y Caballero, A. C. (2019). Apple bagasse as a substrate for the propagation of Patagonian wine yeast biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1414-1425. <https://doi.org/10.1111/jam.14216>
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M., y Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: Diversity, adaptation strategies and biotechnological

- potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 217-241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x>
- Buzzini, P., y Margesin, R. (2014). Cold-Adapted Yeasts: A Lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century. En P. Buzzini & R. Margesin (Eds.), *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance* (pp. 3-22). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_1
- CAFI | Producción de peras y manzanas en Argentina. (2017, mayo 19). <https://www.cafi.org.ar/produccion-de-peras-y-manzanas-en-argentina/>
- Calvo, G., Candan, A. P., Gomila, T., y Colodner, A. D. (2018). *Tecnología de poscosecha de fruta de pepita* [Info:ar-repo/semantics/libro]. Ediciones INTA. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/4201>
- Capdevila, V., Vales, M. E., y Gely, C. (2020). *Análisis de la etapa de hidrólisis de la lactosa del suero lácteo para la obtención de bioetanol*. 11(4), 1-17.
- Carciofi, I. (2022). *Economías regionales: Red de actores, procesos de producción y espacios para agregar valor. Frutas de pepita, azúcar y alcohol*. (p. 72). https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/dt_20_-_economias_regionales_3_-_frutas_de_pepita_y_azucar.pdf
- Carvalho, C. P. P., Nunes, C., y Palou, L. (2012). Control de enfermedades de poscosecha. En *Cítricos: Cultivo, Poscosecha e Industrialización* (pp. 285-305). Serie Lasallista Investigación y Ciencia. Ed. Artes y Letras S.A.S. https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/4981/2012_P%C3%A1ssaro_Control.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Carvalho Castro, Tavares, Araújo, Da Paz, y Gava. (2020). Semi-Commercial Field Evaluation of Yeast Formulations for Control of Mango Postharvest Decay Caused by Botryosphaeriacean Fungi in Organic Production. *International Journal of Fruit Science*, 20(2), 207-220. <https://doi.org/10.1080/15538362.2019.1613469>
- Champagne, C. P., Gardner, N., y Doyon, G. (1989). *Production of Leuconostoc oenos biomass under pH control*. 55(10), 2488-2492. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2488-2492.1989>
- Chand-Goyal, T., y Spotts, R. A. (1997). Biological Control of Postharvest Diseases of Apple and Pear under Semi-commercial and Commercial Conditions Using Three Saprophytic Yeasts. *Biological Control*, 10(3), 199-206. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0568>
- Costa, E., Teixido, N., Usall, J., Atares, E., y Vinas, I. (2001). The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Letters in Applied Microbiology*, 35(2), 117-120. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01133.x>
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Fons, E., Gimeno, V., Delgado, J., y Viñas, I. (2002). Survival of *Pantoea agglomerans* Strain CPA-2 in a Spray-Drying Process. *Journal of Food Protection*, 65(1), 185-191. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.1.185>
- Dal Bello, G., Mónaco, C., Rollan, M. C., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., Ronco, L., y Stocco, M. (2008). Biocontrol of Postharvest Grey Mould on Tomato by Yeasts. *Journal of Phytopathology*, 156(5), 257-263. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01351.x>
- Di Canito, A., Mateo-Vargas, M. A., Mazzieri, M., Cantoral, J., Foschino, R., Cordero-Bueso, G., y Vigentini, I. (2021). The Role of Yeasts as Biocontrol Agents for Pathogenic Fungi on Postharvest Grapes: A Review. *Foods*, 10(7), 1650. <https://doi.org/10.3390/foods10071650>
- Díaz, M. A., Pereyra, M. M., Santander, F. F. S., Perez, M. F., Córdoba, J. M., Alhussein, M., Karlovsky, P., y Dib, J. R. (2020). Protection of Citrus Fruits from Postharvest

- Infection with *Penicillium digitatum* and Degradation of Patulin by Biocontrol Yeast *Clavispora lusitaniae* 146. *Microorganisms*, 8(10), 1477. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101477>
- Dobra, A.C. y Rossini, M. (1993). *Patógenos de postcosecha: Aspectos epidemiológicos, resistencia a fungicidas y su control. Curso Internacional de Sanidad de Frutales de pepita. Capítulo 11* (pp. 1-21).
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess engineering principles* (2nd ed). Elsevier/Academic Press. En P. M. Doran (Ed.), *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)* (pp. vii-viii). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00021-6>
- Droby, S. (2006). *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Difficulties and challenges. Phytopathology Poland*, 39, 105-117.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., y Shachnai, A. (1998). Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus. *Biological Control*, 12(2), 97-101. <https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0615>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., y Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., y Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- El Ghaouth, A., Wilson, C., y Wisniewski, M. (2004). Biologically-Based Alternatives to Synthetic Fungicides for the Control of Postharvest diseases of Fruit and Vegetables. En S. A. M. H. Naqvi (Ed.), *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 511-535). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_14
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M., y Wilson, C. L. (2000). Application of *Candida saitoana* and Glycolchitosan for the Control of Postharvest Diseases of Apple and Citrus Fruit Under Semi-Commercial Conditions. *Plant Disease*, 84(3), 243-248. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.243>
- Ezzougari, R., Bahhou, J., Taoussi, M., Seddiqi Kallali, N., Aberkani, K., Barka, E. A., y Lahlali, R. (2024). Yeast Warriors: Exploring the Potential of Yeasts for Sustainable Citrus Post-Harvest Disease Management t. *Agronomy*, 14(2), Article 2. *Agronomy*, 14(2), 288. <https://doi.org/10.3390/agronomy14020288>
- Ferrari, M. D., Bianco, R., Froche, C., y Loperena, M. L. (2001). Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures. *Biotechnology Letters*, 23(1), 1-4. <https://doi.org/10.1023/A:1026778503871>
- Ferreira, E. M. S., Garmendia, G., Gonçalves, V. N., Da Silva, J. F. M., Rosa, L. H., Vero, S., y Pimenta, R. S. (2023). Selection of Antarctic yeasts as gray mold biocontrol agents in strawberry. *Extremophiles*, 27(2), 16. <https://doi.org/10.1007/s00792-023-01298-z>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., y Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Gomez-Pastor, R., Perez-Torrado, R., Garre, E., y Matall, E. (2011). *Recent Advances in Yeast Biomass Production. Biomass—Detection, Production and Usage*. <https://doi.org/10.5772/19458>
- González Cáceres, M. (2012). Aspectos medio ambientales asociados los procesos de la industria láctea. *Mundo pecuario*, 8(1), 16-32.

- Gonzales Flores, M. (2018). *Saccharomyces uvarum* de ambientes naturales y bebidas fermentadas de la Norpatagonia. Caracterización y potencial para elaborar sidras a bajas temperaturas. Universidad Nacional del Comahue.
- Gorordo, M. F., Lucca, M. E., y Sangorrín, M. P. (2022). Biocontrol Efficacy of the *Vishniacozyma Victoriae* in Semi-Commercial Assays for the Control of Postharvest Fungal Diseases of Organic Pears. *Current Microbiology*, 79(9), 259. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02934-1>
- Gorordo, M. F., Lucca, M. E., y Sangorrín, M. P. (2023). Statistical media optimization using cheese whey powder for production of *Vishniacozyma victoriae* postharvest biocontrol yeast in pears. *Biological Control*, 180, 105203. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105203>
- Govender, V., Korsten, L., y Sivakumar, D. (2005). Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology*, 38(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.04.005>
- Gramisci, B. R. (2019). Optimización de la producción de dos levaduras seleccionadas para su uso como agentes de control biológico en postcosecha de pera. Universidad Nacional del Comahue.
- Gramisci, B. R., Lutz, M. C., Lopes, C. A., y Sangorrín, M. P. (2018). Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. *Biological Control*, 121, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.001>
- He, Y., Degraeve, P., y Oulahal, N. (2024). Bioprotective yeasts: Potential to limit postharvest spoilage and to extend shelf life or improve microbial safety of processed foods. *Heliyon*, 10(3), e24929. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24929>
- Herrero Alvaro, A., y Guardia, J. (1992). *Conservación de frutos: Manual técnico*. Mundi Prensa Libros. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=80160>
- Hu, H., Xu, Y., Lu, H., Xiao, R., Zheng, X., y Yu, T. (2015). Evaluation of yeasts from Tibetan fermented products as agents for biocontrol of blue mold of Nashi pear fruits. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(4), 275-285. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(4), 275-285. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400162>
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., y Alizadeh, A. (2011). A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin*, 41(1), 65-71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x>
- Janisiewicz, W. J., y Jeffers, S. N. (1997). Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, 16(7), 629-633. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(97\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(97)00048-3)
- Janisiewicz, W., y Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology*, 40, 411-441. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>
- Kurtzman, C. P., y Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), 395-399. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00045>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., y Boekhout, T. (Eds.). (2011). The Yeasts, a Taxonomic Study. En *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. xxi-xxii). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00168-3>
- Lappa, I., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., y Kopsahelis, N. (2019). Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*, 8(8), 347. <https://doi.org/10.3390/foods8080347>

- Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., y Vinderola, G. (2014). Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 81(3), 267-274. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000156>
- Li, G., Chi, M., Chen, H., Sui, Y., Li, Y., Liu, Y., Zhang, X., Sun, Z., Liu, G., Wang, Q., y Liu, J. (2016). Stress tolerance and biocontrol performance of the yeast antagonist, *Candida diversa*, change with morphology transition. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2962-2967. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5769-8>
- Lidster, P. D. y Hildebrand, A. (1988). En *Commercial storage of fruits and vegetables* (Vol. 1, pp. 2-45). Agriculture Canada.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S., y Hershkovitz, V. (2011). Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.007>
- Liu, X.-Z., Wang, Q.-M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A. V., Lumbsch, H. T., Millanes, A. M., Wedin, M., Yurkov, A. M., Boekhout, T., y Bai, F.-Y. (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. *Studies in Mycology*, 81(1), 85-147. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001>
- López, S. N., Sangorrín, M. P., y Pildain, M. B. (2016). Fruit rot of sweet cherries and raspberries caused by *Penicillium crustosum* and *Mucor piriformis* in South Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(4), 511-516. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1243582>
- Luo, B., Sun, H., Zhang, Y., Gu, Y., Yan, W., Zhang, R., y Ni, Y. (2019). Habitat-specificity and diversity of culturable cold-adapted yeasts of a cold-based glacier in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2311-2327. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9512-5>
- Lutz, M. C. (2015). *Control biológico de hongos patógenos de peras en postcosecha utilizando levaduras indígenas en la Nor-Patagonia* [Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche.]. <http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/uncomaid/15545>
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Rodriguez, M. E., Sosa, M. C., y Sangorrín, M. P. (2013). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2-3), 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.005>
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Sosa, M. C., y Sangorrín, M. P. (2012). A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 22(12), 1465-1483. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.735223>
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Sosa, M. C., y Sangorrín, M. P. (2020). Semi-commercial testing of regional yeasts selected from North Patagonia Argentina for the biocontrol of pear postharvest decays. *Biological Control*, 150, 104246. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104246>
- Lutz, M. C., Sosa, M. C., y Colodner, A. D. (2017). Effect of pre and postharvest application of fungicides on postharvest decay of Bosc pear caused by *Alternaria—Cladosporium* complex in North Patagonia, Argentina. *Scientia Horticulturae*, 225, 810-817. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.007>
- Macarasin, D., Droby, S., Bauchan, G., y Wisniewski, M. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.07.008>

- Manso, T., y Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.02.004>
- Margesin, R. (2009). Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles*, 13(2), 257-262. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0213-3>
- Mari, M. (2014). Control of fruit postharvest diseases: Old issues and innovative approaches. *Stewart Postharvest Review*, 10(1), 1-4. <https://doi.org/10.2212/spr.2014.1.1>
- Marini, D. B., Maeso, D., Bustamante, A., y Prieto, H. (2020). *Estado del Arte de la Plataforma Regional para la Prevención y Detección Precoz de Enfermedades Cuarentenarias en Frutales en América Latina y el Caribe*. https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Estado_del_arte_Plataforma_Sanidad_final_FTG_6301-19_DianaMarini.pdf
- Massart, S., y Jijakli, H. M. (2007). Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 229-241. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.010>
- Mondino, P. (2009). *Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha*. Universidad de la República, Facultad de Agronomía: CYTED.
- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Muñoz, C. J., Combina, M., Toro, M. E., De Figueroa, L. I. C., y Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.009>
- Nian, L., Xie, Y., Zhang, H., Wang, M., Cheng, S., y Cao, C. (2023). *Vishniacozyma victoriae*: An endophytic antagonist yeast of kiwifruit with biocontrol effect to *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry*, 411, 135442. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135442>
- Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 181-196. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9919-7>
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., Miró, M., y Viñas, I. (2001). Nutritional Enhancement of Biocontrol Activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on Apples and Pears. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), 543-551. <https://doi.org/10.1023/A:1011288710875>
- Park, Y. W., y Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 831-840. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>
- Patiño-Vera, M., Jimenez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., y Galindo, E. (2005). Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 540-550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x>
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., y Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2, Part A), 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.008>
- Ponsone, M. L., Chiotta, M. L., Combina, M., Dalcerro, A., y Chulze, S. (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus section Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.005>
- Robiglio, A., Sosa, M. C., Lutz, M. C., Lopes, C. A., y Sangorrín, M. P. (2011). Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International Journal*

- of *Food Microbiology*, 147(3), 211-216.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.007>
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., y Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003>
- Ryan, M. P., y Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(3), 479-498. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>
- Santagni, A., Nievas, W. E., Di Masi, S. N., y Menni, M. F. (2022). *Prospectiva frutícola del Alto Valle del río Negro al 2035. Revisión del presente frutícola para la construcción de arquetipos de escenarios*. EEA Alto Valle, INTA. https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/13246/INTA_CR_PatagoniaNorte_EEAAltoValle_Santagni_A_Prospectiva_fruticola_alto_valle_rio_negro_al-2035.pdf?sequence=1
- Sanzani, S. M., Nigro, F., Mari, M., y Ippolito, A. (2009). Innovations in the Control of Postharvest Diseases of Fresh Fruits and Vegetables. *Arab Journal of Plant Protection*, 27, 240-244.
- Schisler, D. A., Janisiewicz, W. J., Boekhout, T., y Kurtzman, C. P. (2011). Chapter 4 - Agriculturally Important Yeasts: Biological Control of Field and Postharvest Diseases Using Yeast Antagonists, and Yeasts as Pathogens of Plants. En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 45-52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00004-5>
- Sepúlveda, X., Silva, D., Ceballos, R., Vero, S., López, M. D., y Vargas, M. (2022). Endophytic Yeasts for the Biocontrol of *Phlyctema vagabunda* in Apples. *Horticulturae*, 8(6), 535. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060535>
- Sharma, R. R., Singh, D., y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205-221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
- Shivaji S. y Prasad G.S. (2009). *Antarctic yeasts: Biodiversity and potential applications*. In: *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. Eds. Satyanarayana T. and Kunze G. Springer (pp. 3-16). Springer, Dordrecht.
- Shuler, M. L., y Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering: Basic concepts* (2nd ed, pp. 276-278). Prentice Hall.
- Siddiqui, M. W. (Ed.). (2015). *Postharvest Biology and Technology of Horticultural Crops: Principles and Practices for Quality Maintenance*. Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/b18438>
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)
- Smith, H. S. (1919). On some phases of insect control by the biological method. *Journal of Economic Entomology*, 12(4), 288-292. <https://doi.org/10.1093/jee/12.4.288>
- Snowden, A. L. (2010). *Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables* (Vol. 2). CRC Press. <https://books.google.com.ar/books?id=WK-Scw19skYC>
- Sorensen, S. P. L., C. (1908). I: *Über die quantitative Messung proteolytischer Spaltungen, Die Formoltitrierung*. *Enzymstudien. Biochem Z*, 7, 45-48. 03.
- Spadaro, D., y Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

- Stanbury, P.F., Whitaker, A. y Hall, S.J. (1995). *Media for industrial fermentations*. In P. F. Stanbury, A. Whitaker, & S. J. Hall (Eds.), *Principles of fermentation technology* (2.^a ed., pp. 93-121). Oxford: Perjamon Press.
- Starmer, W. T., y Lachance, M.-A. (2011). Chapter 6—Yeast Ecology. En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 65-83). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9>
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., y Liu, J. (2015). Responses of Yeast Biocontrol Agents to Environmental Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 2968-2975. <https://doi.org/10.1128/AEM.04203-14>
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., y Ait Ben Aoumar, A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/jam.12495>
- Teixidó, N., Usall, J., y Torres, R. (2022). Insight into a Successful Development of Biocontrol Agents: Production, Formulation, Packaging, and Shelf Life as Key Aspects. *Horticulturae*, 8(4), 305. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305>
- Tian, S.-P. (2007). Management of Postharvest Diseases in Stone and Pome Fruit Crops. En A. Ciancio & K. G. Mukerji (Eds.), *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management* (pp. 131-147). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6061-8_5
- Torabi, A., Tabatabaekolour, R., y Hashemi, S. J. (2013). Volume Modelling of Three Apple Varieties Based on Physical Parameters. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology*, 4(5), 461-466.
- Torres, R., Solsona, C., Viñas, I., Usall, J., Plaza, P., y Teixidó, N. (2014). Optimization of packaging and storage conditions of a freeze-dried *Pantoea* agglomerans formulation for controlling postharvest diseases in fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 173-184. <https://doi.org/10.1111/jam.12511>
- Torres, R., Teixidó, N., Viñas, I., Mari, M., Casalini, L., Giraud, M., y Usall, J. (2006). Efficacy of *Candida sake* CPA-1 Formulation for Controlling *Penicillium expansum* Decay on Pome Fruit from Different Mediterranean Regions. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2703-2711. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2703>
- Usall, J., Torres, R., y Teixidó, N. (2016). Biological control of postharvest diseases on fruit: A suitable alternative? *Current Opinion in Food Science*, 11, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.002>
- Valencia Denicia, E., y Ramírez Castillo, M. L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos: Ciencia y cultura*, 16(73), 27-31.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M. B., Bentancur, O., y Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus × domestica*). *FEMS Yeast Research*, 13(2), 189-199. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12021>
- Villalba, M. L., Lutz, M. C., Lopez, S., Pildain, M. B., y Sangorrín, M. P. (2016). Patagonian Antagonist Yeasts for Food Biopreservation. En N. L. Olivera, D. Libkind, & E. Donati (Eds.), *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms* (pp. 301-323). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42801-7_17
- Visintin, G., Gioco, I., García, B., y Fállico, L. (2007). Bioactividad de microorganismos nativos sobre infecciones en naranjas de *Penicillium digitatum* resistente y sensible a fungicidas. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 34, 229-242.

- Wisniewski, M., Macarisin, D., y Droby, S. (2010). Challenges and opportunities for the commercialization of postharvest biocontrol. *Acta Horticulturae*, 877, 1577-1582. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.217>
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., y Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Yang, S. T., y Silva, E. M. (1995). Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2541-2562. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76884-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76884-9)
- Zhang, C., Chen, K., y Wang, G. (2013). *Combination of the biocontrol yeast Cryptococcus laurentii with UV-C treatment for control of postharvest diseases of tomato fruit. BioControl*, 58(2), 269- 281. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-012-9477-8>
- Zhang, J., y Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 407-421. <https://doi.org/10.1007/s002530051411>
- Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y., y Tian, S. (2020). Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *Journal of Fungi*, 6(3), 158. <https://doi.org/10.3390/jof6030158>
- Zhihui, B., Jin, B., Li, Y., Chen, J., y Li, Z. (2008). Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 353-358. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60055-8)
- Zhimo, V. Y., Bhutia, D. D., Saha, J., y Panja, B. (2014). Exploitation of Yeasts as an Alternative Strategy to Control Post Harvest Diseases of Fruits-A Review. *World Applied Sciences Journal*, 3(5), 785-793.