

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
FACULTAD DE INGENIERÍA**



1972

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORA EN INGENIERÍA**

OPTIMIZACIÓN Y ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE UNA LEVADURA SELECCIONADA COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO PARA POSTCOSECHA DE PERAS



Ing. María Florencia Gorordo
Directora: Dra. Marcela Paula Sangorrin
Co-Directora: Dra. María Ester Lucca

Julio 2024 - Neuquén, Argentina

AGRADECIMIENTOS

A mi directora la Dra. Marcela Sangorrín que me recibió, acompañó y guió durante estos 6 años. Gracias Marce por compartir todos tus conocimientos sobre control biológico, por tu paciencia, compañía y estar siempre presente tanto de forma profesional como personal.

A mi co-directora la Dra. María Ester Lucca. Gracias Pepé por permitirme hacer las pasantías en PROIMI y por inculcar en mí el amor por los bioprocesos desde mis años de estudiante en la Universidad de Río Negro (allá por el 2014).

A la empresa La Deliciosa (Centenario, Neuquén), que dispuso de sus instalaciones, mano de obra, insumos y frutas para poder realizar los experimentos en cada temporada.

Al CONICET, por la beca doctoral otorgada mediante la cual fue posible realizar este posgrado. A la Universidad Nacional de Río Negro y a la Universidad Nacional del Comahue. No hubiera podido formarme en esto que tanto me apasiona sin la Educación Pública y Gratuita.

A todos los integrantes del instituto PROBIEN, por su buena onda y compañerismo cada vez que necesité ayuda con el reactor, algún otro equipo y/o determinación, especialmente a Horacio y a Carmen.

A todos los integrantes del laboratorio de Micro. En primer lugar, a Betina que durante el primer año me enseñó todo sobre el control biológico y cómo manejarme en el laboratorio, por ponerme apodos y hacer las mañanas más divertidas. A Virginia, que siempre me escuchó y aconsejó de la forma más sincera y profesional. A Andrea y Melisa, por ayudarme cuando necesite una mano con los temas de biología molecular. A Josefina, por estar ahí ayudándome y cubriéndome cada vez que se lo pedí. A Chris y Euge dos grandes que estuvieron presentes con sus consejos y buena onda de siempre. Pero sobre todo agradecerles a todos ellos (incluidas Vicky K., Vicky D. y Belén) por tantos mates, charlas, risas compartidas, viajes a cursos/congresos juntas y por consolarme en alguna que otra lloradita.

A los chicos del PROIMI, Martín, José, Víctor y Osvaldo. Por la buena onda, por ayudarme, acompañarme y enseñarme muchas cosas durante mis dos estancias en Tucumán.

A mi papá y mi mamá. Por inculcarme tantos valores, por impulsarme siempre a estudiar lo que me gusta y a seguir perfeccionándome. A ellos y a mis hermanos, por escucharme en todo momento y acompañarme durante todo este camino.

A mi familia de cuatro patas, mis gatos (Blanca, Pucará y SoHe) por ser una compañía incondicional durante horas y horas de estudio y trabajo. Firmes siempre a mi lado.

A mi novio Damián, por estar siempre conmigo, escucharme y acompañarme fines de semana y feriados a toda hora al laboratorio a tomar muestras o a mover el reactor.

Al resto de mi familia (abuela, tías/tíos, primas/os, suegra, cuñadas), mis amigas/os del secundario, la universidad y la vida, por estar presentes de una forma u otra y acompañarme desde su lugar estos años.

RESUMEN

El Alto Valle de Río Negro y Neuquén concentra el 90% de la superficie de la producción de peras y manzanas del país. Durante el periodo de almacenamiento la fruta es susceptible a ser atacada por diversos hongos fitopatógenos, los más 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 comúnmente la primera medida en el control de enfermedades postcosecha. Sin embargo, está siendo actualmente reconsiderada debido a los problemas de toxicidad que provoca. El Control Biológico resulta una alternativa para la sustitución de estos fungicidas, con ventajas para la sostenibilidad ambiental y producción de fruta orgánica.

La levadura *Vishniacozyma victoriae* ha sido aislada y seleccionada previamente en nuestro laboratorio como agente de control biológico (ACB). En esta Tesis se optimizaron dos medios de cultivo basados en residuos agroindustriales para la producción de biomasa de la levadura.

Inicialmente se utilizó suero de queso en polvo (SQP) con el objetivo de optimizar el medio de cultivo. Se realizó un diseño estadístico experimental (DEE) evaluando diferentes concentraciones de SQP, KH_2PO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Con la mejor condición determinada a partir de la ecuación del modelo, se llevó a cabo la validación del medio de cultivo: SQP, 80 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 g/L; KH_2PO_4 , 10 g/L. experimentales. Para obtener una medida cuantitativa del rendimiento del modelo, se calculan dos índices de validación: factor de precisión (A_f) y factor de sesgo (B_f). Los valores obtenidos de A_f y B_f fueron de 1,13 y 0,91 respectivamente, valores que permiten validar el modelo. Con este medio de cultivo optimizado, se llevó a cabo la producción de biomasa de la levadura a escala laboratorio, en reactor *batch* de 12 L, en reactor semicontinuo (RSC) de 27 L y a escala piloto, en reactor *batch* de 100 L. A escala laboratorio, el cultivo en RSC permite obtener mejor resultados que en reactor *batch*, ya que aumenta tres órdenes de magnitud las células viables por mL y en 1,2 veces la biomasa total obtenida. Por otro lado, a escala piloto, la producción en reactor *batch* supera en gran medida la producción de biomasa en el mismo tipo de reactor. Logrando duplicar el peso seco por litro y aumentando en un orden de magnitud las células viables totales y duplicar la productividad volumétrica.

Se evaluó el secado de la biomasa por liofilización y secado *spray*. Se evaluaron distintos protectores, resultando en glutamato monosódico (GMS) 1% p/v con SQP o leche descremada en polvo (LDP) 30% p/v los mejores. Durante la liofilización se pierden dos órdenes de magnitud de viabilidad de las levaduras, mientras que, durante el secado *spray* redujo en siete ordenes de magnitud la viabilidad de la biomasa luego del proceso, alcanzando porcentajes de viabilidad menores al 15% durante el período de almacenamiento. Esto puede deberse a las altas temperaturas del proceso.

Una segunda optimización se llevó a cabo utilizando mosto de manzana (MM), se realizó un DEE obteniendo que el mejor medio de cultivo para la producción de biomasa es: MM, 44% v/v; KH_2PO_4 , 7,3 g/L y urea, 2 g/L. Para la validación, el valor obtenido fue el mismo para A_f y B_f de 1,12, valores que permiten validar el modelo. Con este medio de cultivo optimizado, se llevó a cabo la producción de biomasa de la levadura a escala laboratorio, en reactor *batch* de 12 L, en RSC de 27 L. Como ocurre con SQP, la producción en RSC permite obtener mejores resultados en cuanto a producción de biomasa

que el reactor *batch*, ya que aumenta en seis ordenes de magnitud las células viables por mL y 2,4 veces la biomasa total obtenida.

Se evaluó la formulación seca del ACB por liofilización con GMS 1% p/v como crioprotector en combinación con SQP o LDP 30% p/v como agentes protectivos. Se obtuvieron porcentajes de viabilidad entre 30 y 70% luego de 90 días de conservación. Esta metodología de secado disminuye entre uno y dos órdenes de magnitud la biomasa viable luego del proceso.

La biomasa obtenida en ambos medios de cultivo optimizados en las diferentes escalas, tanto fresca como liofilizada-rehidratada, fue evaluada en ensayos a escala semicomercial. Se evaluó el agregado de CaCl_2 (2% p/v) como potenciador del antagonismo y distintos tiempos de conservación en frío de la biomasa fresca antes de su aplicación. Se evaluó la incidencia natural de las enfermedades naturales causadas por *P. expansum*, *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium* spp. Cuando se evaluó la aplicación de la levadura sola o en combinación con CaCl_2 , se observó que el agregado de esta sal mejora la capacidad antagónica de *V. victoriae* (efecto sinérgico), aumentando los porcentajes de control. Los porcentajes de control obtenidos superan el 50% y en algunos casos alcanzan el 100% de control, con la levadura fresca y rehidratada (liofilizada). Cuando la biomasa fresca 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 los porcentajes de incidencia provocados por los hongos fitopatógenos estudiados fueron mayores en pera que en manzanas, sin embargo, los porcentajes de control con el ACB fueron superiores en peras. En cuanto al medio utilizado para producir el ACB, un mejor nivel de biocontrol se alcanza cuando las levaduras crecen en el medio de cultivo optimizado con SQP, sin embargo, rendimientos y productividades similares se observan cuando las levaduras crecidas en el medio de cultivo optimizado con MM.

El uso de *V. victoriae* como ACB es una herramienta con gran potencial de aplicación para controlar las enfermedades fúngicas en la producción de fruta orgánica de la zona, siendo respetuosos con el medio ambiente y sin generar efectos secundarios. Permitiendo reducir o sustituir el uso de fungicidas químicos debido a su impacto en la salud de los consumidores y el medio ambiente.

ABSTRACT

The high Valley of Río Negro and Neuquén concentrates 90% of the country's pear and apple production surface area. During the storage period the fruit is susceptible to attack by various phytopathogenic fungi, the most important pathogens present are *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*, and in recent years *Alternaria-Cladosporium* spp. have appeared in the region. The use of fungicides is the first step in the control of postharvest diseases. However, it is currently being reconsidered because of toxicity. Biological control is an alternative for the substitution of chemical fungicides, with advantages for environmental sustainability and organic fruit production.

The yeast *Vishniacozyma victoriae* has been previously isolated and selected in our laboratory as a biological control agent (BCA). In this thesis, two culture media based on agro-industrial wastes were optimized for yeast biomass production.

First, cheese whey powder (CWP) was used in order to optimize the culture medium. An experimental statistical design (SED) was performed evaluating different concentrations of CWP, KH_2PO_4 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. With the best condition determined from the model equation, validation of the culture medium was carried out: CWP, 80 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 g/L; KH_2PO_4 , 10 g/L. To obtain a quantitative measure of model performance, two validation indices were calculated: accuracy factor (A_f) and bias factor (B_f). The values obtained for A_f and B_f were 1.13 and 0.91, respectively, values that allow validation of the model. With this optimized culture medium, yeast biomass production was carried out at laboratory scale, in a 12 L batch reactor, in a 27 L semi-continuous reactor (SCR) and at pilot scale, in a 100 L batch reactor. At laboratory scale, SCR culture gives better results than in a batch reactor, since it increases the number of viable cells/mL by three orders of magnitude and the total biomass obtained by 1.2 times. On the other hand, at pilot scale, batch reactor production greatly exceeds biomass production in the same type of reactor. It achieves a doubling of dry weight per liter, increases total viable cells by an order of magnitude and doubles volumetric productivity.

Drying of the biomass by lyophilization and spray drying was evaluated. Different protectants were evaluated, resulting in monosodium glutamate (MSG) 1% (w/v) with CWP or powdered skim milk (PSM) 30% (w/v) being the best. During freeze-drying, two orders of magnitude of yeast viability were lost, while during spray drying the viability of the biomass was reduced by seven orders of magnitude after the process, reaching viability percentages of less than 15% during the storage period. This may be due to the high temperatures of the process.

A second optimization was carried out using apple must (AM), a SED was performed, obtaining that the best culture medium for biomass production is: AM, 44% v/v; KH_2PO_4 , 7.3 g/L and urea, 2 g/L. For validation, the value obtained was the same for A_f and B_f of 1.12, values that allow validation of the model. With this optimized culture medium, yeast biomass production was carried out at laboratory scale, in a 12 L batch reactor and in a 27 L SCR. As with CWP, production in SCR yields better results in terms of biomass production than in the batch reactor, since it increases the number of viable cells/mL by six orders of magnitude and the total biomass obtained by 2.4 times.

The dry formulation of BCA was evaluated by lyophilization with MSG 1% (w/v) as cryoprotectant in combination with CWP or PSM, 30% (w/v) as protective agents. Viability percentages between 30 and 70% were obtained after 90 days of preservation. This drying

methodology decreases the viable biomass after the process by one or two orders of magnitude.

The biomass obtained in both optimized culture media at different scales, both fresh and freeze-dried-rehydrated, was evaluated in semi-commercial scale trials. The addition of CaCl₂ (2% w/v) as antagonism enhancer and different cold storage times of the fresh biomass before its application were evaluated. The natural incidence of natural diseases caused by *P. expansum*, *B. cinerea* and *Alternaria-Cladosporium* spp. was evaluated. When the application of the yeast alone or in combination with CaCl₂ was evaluated, it was observed that the addition of this salt improves the antagonistic capacity of *V. victoriae* (synergistic effect), increasing the control percentages. The control percentages obtained exceed 50% and in some cases reach 100% control with fresh and freeze-dried-rehydrated biomass. When the fresh biomass was applied immediately after production, the control percentages are higher than when the fresh biomass was kept at 4°C for a period of time. Generally, the trials showed that the incidence percentages caused by the phytopathogenic fungi studied were higher in pears than in apples; however, the control percentages with BCA were higher in pears. Regarding the medium used to produce the CBA, a better level of biocontrol is achieved when yeasts were grown in the culture medium optimized with CWP, however, similar yields and productivities are observed when yeasts were grown in the culture medium optimized with AM.

The use of *V. victoriae* as a BCA is a tool with great application potential to control fungal diseases in organic fruit production in the area, being environmentally friendly and without generating side effects. It allows reducing or substituting the use of chemical fungicides due to their impact on the health of consumers and the environment.

ÍNDICE

NOMENCLATURA.....	A
INTRODUCCIÓN.....	1
1 Producción de frutas de pepita en Argentina.....	2
1.1 Cadena productiva de la fruta de pepita.....	3
1.2 Producción orgánica de frutas de pepita.....	4
1.3 Procesamiento de la fruta para consumo en fresco.....	5
1.3.1 Momento oportuno de cosecha.....	5
1.3.2 Proceso de empaque.....	6
1.3.3 Sistemas de almacenamiento de fruta.....	8
2 Pérdidas en postcosecha en frutas de pepita.....	9
2.1 <i>Penicillium expansum</i>	10
2.2 <i>Botrytis cinerea</i>	11
2.3 Proceso de infección.....	12
3 Manejo de enfermedades postcosecha.....	12
3.1 Aplicación de fungicidas de síntesis química.....	13
4 Control biológico postcosecha.....	14
4.1 Mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACB).....	18
4.2 Mejoramiento de la acción biocontroladora de los ACB.....	19
4.2.1 Adición de sales inorgánicas.....	20
4.3 Desarrollo de un ACB.....	20
4.3.1 Cultivos por lotes o <i>batch</i>	24
4.3.2 Cultivo semicontinuo.....	25
4.3.3 Escalado de la producción de biomasa.....	25
4.4 Factores que influyen en el proceso de producción.....	28
4.4.1 Factores nutricionales.....	29
4.4.2 Factores físicos.....	30
4.5 Sustratos económicos para la formulación de medios de cultivo.....	31
4.5.1 Suero de queso.....	32
4.5.2 Mosto de manzana.....	33
5 Empleo de diseño estadístico de experimentos.....	34
5.1 Aplicación de diseños estadísticos experimentales (DEE) para la optimización de producción de biomasa.....	36
5.1.1 <i>Screening</i> de factores.....	36
5.1.2 Metodología de la superficie de respuesta.....	37

5.1.3	Diseño central compuesto.....	38
5.1.4	Validación.....	39
6	Formulación.....	40
7	Ensayos a escala semicomercial	41
8	Levaduras como agentes de control biológico.....	42
8.1	Biología de las levaduras	43
8.2	Levaduras como ACB en Argentina.....	44
8.3	<i>Vishniacozyma victoriae</i> como ACB.....	45
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
	Hipótesis de trabajo	48
	Objetivo general	48
	Objetivos específicos	48
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1	Preparación del material biológico y vegetal.....	50
1.1	Microorganismo y preparación de inóculo	50
1.2	Frutas de producción orgánica.....	50
1.3	Frutas de producción convencional	51
2	Optimización de medios de cultivos.....	51
2.1	Evaluación del crecimiento de las levaduras en diferentes medios de cultivo	51
2.2	Modelado del crecimiento	52
2.3	Diseño estadístico experimental (DEE).....	52
2.4	Validación de medios de cultivos optimizados	53
3	Métodos analíticos	53
3.1	Cuantificación del crecimiento de las levaduras.....	53
3.2	Cuantificación de azúcares	54
3.3	Cuantificación de nitrógeno libre	54
3.4	Determinación de proteínas	54
4	Producción de biomasa	55
4.1	Reactor a escala laboratorio.....	55
4.1.1	Reactor <i>batch</i>	56
4.1.2	Reactor semicontinuo	56
4.2	Producción de biomasa en reactor a escala piloto	57
4.3	Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La).....	58
5	Separación de levaduras del medio de cultivo por filtración tangencial	59
6	Evaluación de diferentes técnicas para la formulación del ACB.....	59

6.1	Formulación líquida.....	59
6.2	Formulación seca	60
6.2.1	Liofilización.....	60
6.2.2	Secado spray	60
7	Ensayos en línea de empaque	62
7.1	Aplicación de las levaduras antagonistas	62
7.2	Efecto del sistema de aplicación sobre las levaduras	64
7.3	Capacidad de colonización de las levaduras sobre la superficie de fruta	64
7.4	Análisis estadísticos.....	64
	RESULTADOS	66
	Empleo de un medio de cultivo basado en suero de queso para el desarrollo del agente de control biológico <i>V. victoriae</i>	67
1	Caracterización del suero de queso en polvo (SQP).....	68
1.1	Evaluación de SQP como medio de cultivo	69
2	Producción de biomasa en reactor <i>batch</i> de 15 L	69
2.1	Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica de fruta.....	70
2.2	Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras.....	73
3	Optimización de la producción de biomasa de <i>V. victoriae</i>	73
3.1	Diseño central compuesto.....	73
3.1	Validación.....	76
4	Determinación de k_{La}	77
5	Producción de biomasa de levadura en medio optimizado.....	78
5.1	Evaluación del ACB con agregado de $CaCl_2$ a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica.....	80
5.2	Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras.....	82
6	Evaluación de diferentes técnicas para la formulación del ACB.....	83
6.1	Formulación líquida.....	83
6.2	Formulación seca	84
7	Ensayos a escala semicomercial en empaque orgánico de la levadura fresca y liofilizada producida en diferentes configuraciones de reactor	85
7.1	Producción de biomasa como LSA en reactor <i>batch</i> con SQP.....	85
7.2	Evaluación de SQP proteico para la producción de biomasa	87
7.3	Ensayos a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica de la levadura fresca y liofilizada.....	88
7.4	Aplicación y colonización de las levaduras en la superficie de la fruta almacenada en frío.....	89

8 Producción de biomasa en reactor con dos configuraciones: <i>batch</i> y <i>semicontinuo</i> : evaluación en línea de empaque convencional.....	91
8.1 Producción de biomasa en reactor <i>batch</i>	91
8.2 Producción de biomasa en reactor semicontinuo.....	93
8.3 Ensayos a escala semicomercial en línea de empaque de producción convencional.....	94
8.4 Aplicación del ACB y colonización de las levaduras en la superficie de la fruta almacenada en frío.	96
9 Producción de biomasa de ACB en reactor con dos configuraciones: <i>batch</i> 100 L y semicontinuo, evaluación en línea de empaque orgánica.....	97
9.1 Producción de biomasa de ACB en RSC en medio optimizado.....	97
10 Escalado de la producción de biomasa de ACB a 100 L en planta piloto	99
10.1 Dimensiones de reactores	99
10.2 Escalado según k_{La}	99
10.3 Producción de biomasa a escala piloto en reactor <i>batch</i> de 140 L	99
10.1 Secado por liofilización	101
10.2 Secado por spray.....	102
11 Ensayos a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica	102
11.1 Aplicación y colonización de las levaduras en la superficie de la fruta almacenada en frío	104
Empleo de un medio de cultivo basado en mosto de manzana para el desarrollo del agente de control biológico <i>V. victoriae</i>	107
1 Caracterización del mosto de manzana (MM).....	108
1.1 Evaluación de MM como medio de cultivo.....	109
2 Producción de biomasa en reactor <i>batch</i> de 15 L	110
2.1 Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica	111
2.2 Colonización por levaduras de la superficie de la fruta almacenada en frío	112
3 Optimización de la producción de biomasa de <i>V. victoriae</i>	113
3.1 Primera optimización del medio de cultivo	113
3.2 Segunda optimización.....	115
3.2.1 Validación del medio de cultivo.....	117
4 Liofilización con crioprotectores	117
5 Determinación de k_{La}	120
6 Producción de biomasa de levadura en medio optimizado basado en mosto de manzana en reactor con dos configuraciones: <i>batch</i> y semicontinuo.....	121
6.1 Reactor <i>batch</i> de 15 L.....	121
6.1.1 Viabilidad de la biomasa liofilizada	123
6.2 Producción de biomasa en reactor semicontinuo.....	124

6.3	Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica	126
6.3.1	Aplicación y colonización de la superficie de la fruta de la levadura	128
6.4	Ensayo en línea de empaque de producción convencional de fruta	129
6.4.1	Aplicación y colonización por levaduras de la superficie de la fruta almacenada en frío... ..	130
7	Producción de biomasa en reactor semicontinuo.....	132
7.1	Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica	133
7.2	Aplicación y colonización por levaduras de la superficie de la fruta almacenada en frío.....	134
	DISCUSIÓN.....	137
1	Optimización de medios de cultivo y producción de biomasa	138
1.1	Optimización de un medio de cultivo basado en suero de queso en polvo	140
1.1.1	Comparación de escalas.....	142
1.2	Optimización de un medio de cultivo basado en mosto de manzana	144
1.2.1	Comparación de escalas.....	146
2	Proceso <i>downstream</i>	148
3	Formulación del ACB.....	148
4	Evaluación de la capacidad antagónica de <i>V. victoriae</i> en ensayos a escala comercial.	152
	CONCLUSIONES.....	159
	Perspectivas futuras	161
	BIBLIOGRAFÍA	162

NOMENCLATURA

ACRÓNIMOS

AC: atmósfera controlada	-
ACB: agente de control biológico	-
ADE: agua destilada estéril	-
A_f : factor de precisión	-
AM: atmósfera modificada	-
ART: azúcares reductores totales	g/L
atm: atmosfera	-
AVRNyN: Alto Valle de Río Negro y Neuquén	-
BF: biomasa fresca	-
B_f : factor de sesgo	-
BLR: biomasa liofilizada-rehidratada	-
\bar{C}_{AL} : concentración de oxígeno disuelto constante	mg/L
C_{AL}^* : solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo	mg/L
C_{AL} : oxígeno disuelto	mg/L
CB: Control Biológico	-
C_{crit} : concentración de oxígeno crítica	mg/L
DCC: Diseño Central Compuesto	-
DEE: Diseño Estadístico Experimental	-
DNS: ácido 3,5 dinitrosalicílico	-
DO: densidad óptica	nm
FAN: nitrógeno fácilmente asimilable	ppm
FCE: Fuente de carbono y energía	-
GLM: Modelo linealmente generalizado	-
GMS: glutamato monosódico	-
GRAS: Generally Regarded As Safe (Considerados generalmente como seguros)	-
HPLC: cromatografía líquida de alta performance	-

HR: Humedad relativa	%
Kg: kilogramo	-
k_{La} : coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	h^{-1}
lb: libras	-
LDP: leche descremada en polvo	-
LSA: levadura seca activa	-
min: minuto	-
mL: mililitro	-
mm: milímetro	-
MM: mosto de manzana	-
MSR: metodología de superficie de respuesta	-
NPCC: North Patagonia Culture Collection (Colección de Cultivos Patagonia Norte)	-
p/p: peso/peso	g/g
p/v: peso/volumen	g/mL
ppm: partes por millón	mg/L
Q: caudal volumétrico	mL/h
RB: reactor <i>batch</i>	-
r_o : tasa volumétrica de consumo de oxígeno	mg/L.seg
rpm: revoluciones por minuto	h^{-1}
RSC: reactor semicontinuo	-
SQ: suero de queso	-
SQP: suero de queso en polvo	-
SQPP: suero de queso en polvo protéico	-
SS: sólidos solubles	°Brix
UFC: unidades formadoras de colonias	-
UV: ultravioleta	-
v/v: volumen/ volumen	mL/mL
vvm: volumen de aire por volumen de medio de cultivo por unidad de tiempo	L/L.h

$Y_{X/S}$: rendimiento de biomasa producida con respecto a sustrato consumido $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$

LETRAS LATINAS

e: número de Euler 2,7182

h: horas -

I: incidencia %

t: tiempo h,
días

X: biomasa g/L

SIMBOLOS GRIEGOS

μ_{max} : velocidad específica de crecimiento máxima h^{-1}

INTRODUCCIÓN



1 Producción de frutas de pepita en Argentina

Argentina, se encuentra en el puesto 17 como productora de frutas en general, con 5.322.357 tn, 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 frutas de pepitas actual alcanza las 560.000 tn para peras y 420.000 tn para manzanas. Si bien la producción es baja en comparación con el periodo 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. En cuanto a las principales variedades de peras plantadas (Figura 1), William's Bon Chrétien suma 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 (Figura 1), 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, los principales importadores son Brasil con 100.000 tn, Rusia con 88.000 tn y la Unión Europea con 30.000 tn, y, en menor medida, países asiáticos y latinoamericanos. En caso de manzanas, el principal destino es el mercado interno con el 32% del total, la exportación representa el 25% y la industria el 43% (Santagni et al., 2022).

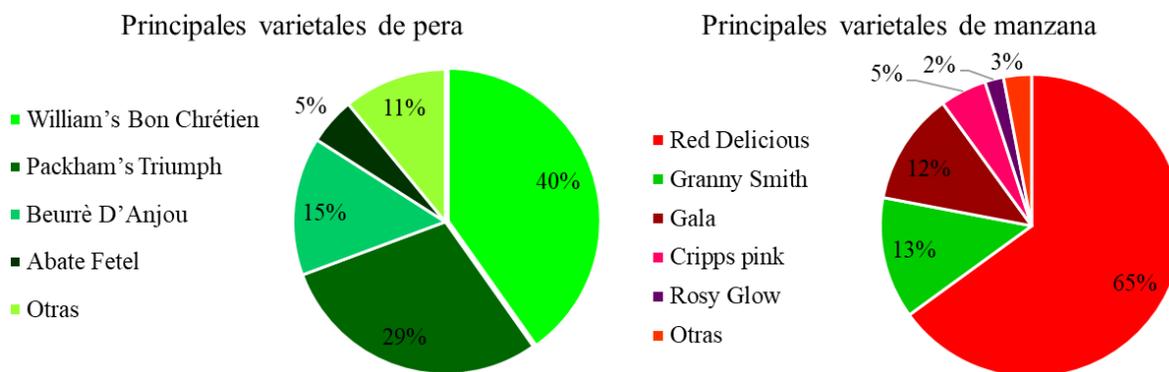


Figura 1. Porcentaje de distribución plantada con las variedades principales de frutas de pepita.

Si bien, el principal varietal de pera producido en la región es William's Bon Chrétien, este solo se vende en fresco y no es apto para periodos largos de conservación. Por otro lado, los varietales Packham's Triumph y Beurré D'Anjou pueden permanecer en conservación durante 6-7 meses, lo que lo hace varietales más apropiados para la aplicación de agentes de control biológico. Red Delicious además de ser el principal varietal producido de manzana, es el único de larga conservación.

1.1 Cadena productiva de la fruta de pepita

En la cadena productiva de la pera y de la manzana, se distinguen dos etapas: la producción y el proceso industrial. La mayor parte de la producción de esta fruta se destina al consumo en fresco, siendo el 60% de esta producción destinada a exportación. La etapa industrial es la que se ocupa del procesamiento de la fruta en fresco y comprende el empaque y la conservación en frío previa a la llegada al consumidor. El procesamiento de la fruta en fresco para la exportación va desde la clasificación de la fruta (bajo parámetros de sanidad, tamaño y color) hasta el envasado que difiere según el destino de exportación. Para que la fruta conserve sus cualidades, durante todo el tiempo que se encuentre en conservación hasta la venta local o exportación, la utilización de cámaras a baja temperatura es indispensable. Los frigoríficos que se encuentran localizados en la zona del AVRNYN utilizan dos tipos de tecnologías para este fin: frío convencional y atmósfera controlada. La fruta de exportación está sujeta a una serie de barreras arancelarias y barreras no arancelarias. Las arancelarias corresponden al pago de un arancel según el destino de exportación mientras que las no arancelarias (presentes principalmente en la

Unión Europea y Brasil) son exigencias basadas en el producto, como los límites máximos de residuos agroquímicos y contaminantes. Los límites de estos residuos se suelen basar en las Buenas Prácticas Agrícolas y tienen el fin de lograr frutas sin efectos tóxicos para la salud humana. En respuesta a estos requerimientos ha surgido la producción orgánica de frutas, que no permite la utilización de productos de síntesis química y que busca preservar la calidad de los frutos mediante el uso de tecnologías no agresivas para la salud humana y respetuosas del medio ambiente (SENASA, 2018).

1.2 Producción orgánica de frutas de pepita

La producción orgánica de frutas en Argentina ha crecido en los últimos 20 años en forma muy significativa, posicionándose a nivel mundial en segundo lugar, después de Australia, en lo que se refiere a superficie orgánica (3,2 millones de hectáreas). El principal destino de la producción orgánica es la exportación, siendo Norteamérica y Europa los principales destinos. Argentina fue pionera en la legislación de cultivos orgánicos y las empresas certificadoras son reconocidas internacionalmente (Ernst, 2020).

Según los últimos informes realizados por el SENASA hay unas 12.000 ha frutícolas bajo este sistema de producción. La mayor parte se ubica en el Valle del Rio Negro con montes de manzanas y peras. Con una superficie de 6.240 ha que aportan el 52% a la superficie nacional de frutas orgánicas (SENASA, 2022). En caso de la exportación su preponderancia es aún mayor. De las casi 45-50.000 tn 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 incidencia 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; transforman al Valle en un lugar ideal para la producción de frutas y especialmente la que requiere denominación de orgánica. Por otro lado, hay un contexto favorable creciente en cuanto a agricultores con mente abierta y profesionales idóneos (Ernst, 2020).

Durante los últimos 10 años la exportación total de peras ha disminuido progresivamente, pasando de las 450.000 a las 300.000 tn. Durante ese periodo, la de peras

orgánicas pasó de 22-24.000 a 25-30.000 tn, incrementándose el interés tanto de los países importadores como de los consumidores por los productos orgánicos. Dada esta importancia de la producción de peras orgánicas para exportación, es que la mayoría de nuestros ensayos fueron realizados para esta fruta de pepita.

1.3 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 & 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 & Guardia, 1992).

1.3.1 Momento oportuno de cosecha

Un tercio de la producción se pierde entre el momento de la cosecha, transporte y empaque, lo que representa una merma significativa de alimentos y un considerable daño económico (Wilson, 2018). El tratamiento de la fruta durante estas etapas es determinante para el mantenimiento de todos los atributos que se obtuvieron en el campo. Desde el punto de vista fisiológico, el modo en que se realiza la cosecha influye directamente sobre los atributos de la fruta, ya que suele ser el origen de numerosos daños que afectan a la calidad de la misma. La cosecha estimula los cambios metabólicos asociados con la madurez y la senescencia (Lidster et al., 1988). Es por esto, que el momento oportuno de cosecha y el manejo apropiado de la fruta resultan claves para el éxito final del producto. El momento oportuno de cosecha está relacionado con el estado fisiológico de los frutos y con el destino posterior de los mismos. Las peras y las manzanas son frutos climatéricos, lo cual permite que sean cosechados con distintos estados de madurez y continuar su maduración fuera de la planta. Las cosechas tempranas y medias responden a estrategias comerciales de

almacenamiento a largo plazo; mientras que las cosechas tardías (frutos maduros en planta), a comercialización inmediata.

El estado de madurez de la fruta al momento de la cosecha resulta fundamental en el desarrollo de podredumbres. Las manzanas y peras deben cosecharse antes del pico climatérico, con lo cual los frutos son más firmes y resistentes a daños mecánicos. Además, la resistencia interna de los frutos contra enfermedades fúngicas disminuye con la madurez (Tian, 2007). Esto significa que el momento de cosecha condiciona la susceptibilidad a diferentes enfermedades de los frutos.

1.3.2 Proceso de empaque

Después de la cosecha, la fruta es transportada en bines 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. En el procesamiento pueden identificarse las distintas etapas (Figura 2).

El proceso comienza con la descarga de la fruta contenida en bines 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.

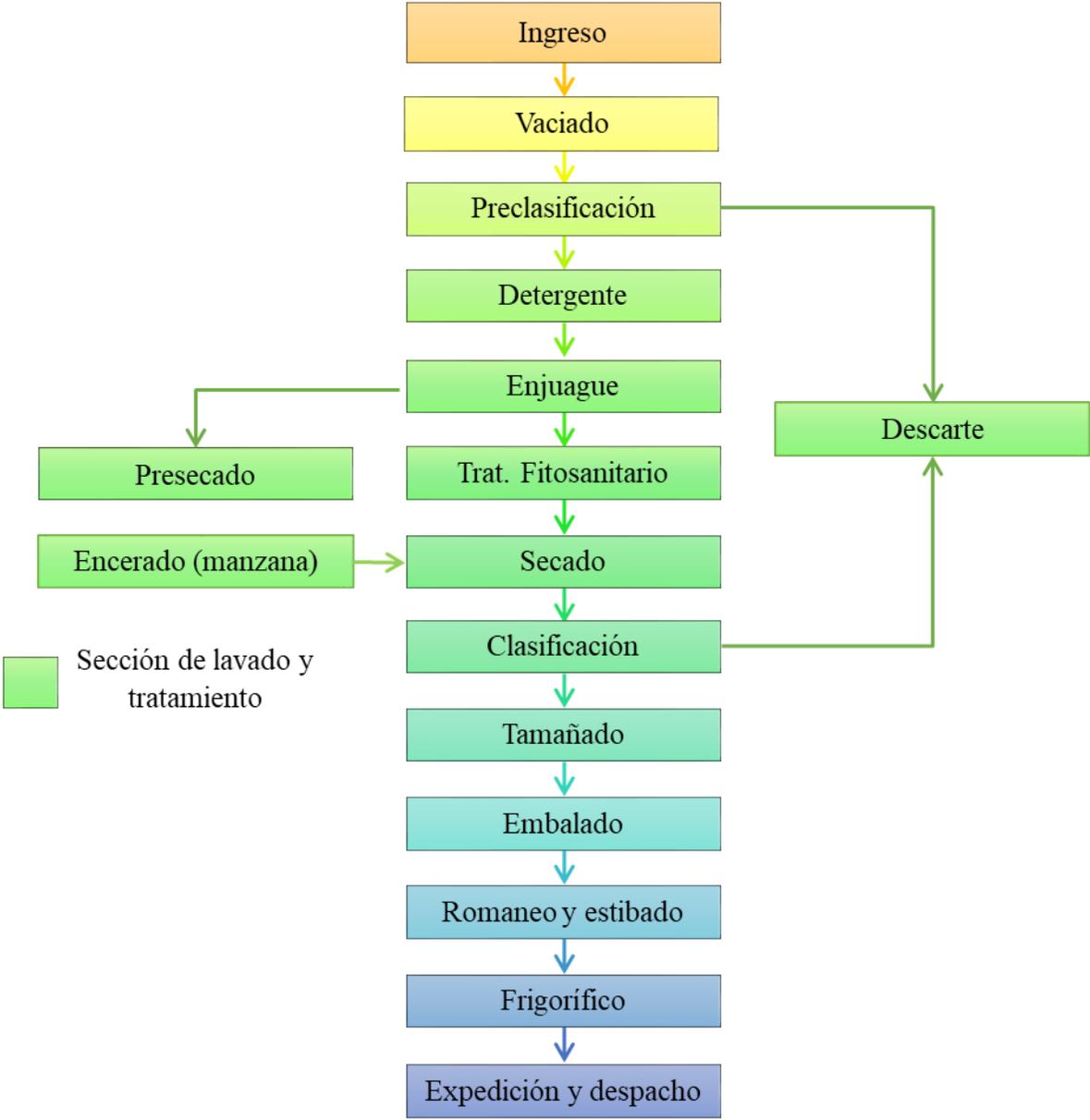


Figura 2. Diagrama del procesamiento en la línea de empaque para frutales de pepita (peras y manzanas).

La fruta seleccionada pasa al sector de tamaño donde una balanza (mecánica o electrónica) discriminan los frutos en función de su peso o de su diámetro. Finalmente, la fruta seleccionada según su grado de calidad y tamaño es embalada. El proceso de

embalado se realiza de forma manual en donde los frutos son tomados individualmente de la cinta transportadora o del “tambor” por un operario, y colocados en bandejas dentro del envase correspondiente, el cual, una vez lleno, circula sobre una cadena transportadora hacia el sector de romaneo y estibado. En esta etapa se identifica el producto para mantener su trazabilidad. Los envases se paletizan de acuerdo con el tamaño y grado de calidad de los frutos, así como del envase y el destino. Luego la fruta es almacenada o distribuida.

1.3.3 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 & Candan, 2018).

A continuación, se describen los tres sistemas de conservación más utilizados en la región del AVRNYN:

El **frío convencional** se basa en la conservación a temperaturas en torno a los 0°C, sin que intervengan otros factores reductores del metabolismo. El manejo de la temperatura es la herramienta más efectiva para extender la vida postcosecha de los frutos, ya que reduce la respiración, el calor de respiración, la producción de etileno, la pérdida de agua y la susceptibilidad al ataque de patógenos (Calvo & Candan, 2018). Para las peras, la temperatura óptima de conservación es de $-0,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Villalba et al., 2016). 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%.

La **atmósfera controlada** (AC) consiste en reducir el contenido de O₂ e incrementar el de CO₂ con respecto a la composición en el aire. La proporción de ambos gases es controlada durante todo el periodo de almacenamiento en niveles preestablecidos (Barkai-Golan, 2001). Las cámaras deben estar a temperatura de conservación 24 horas antes de ingresar la fruta. El uso de AC mejora el efecto de la refrigeración sobre la actividad metabólica de los frutos, permitiendo que las temperaturas de conservación sean un poco más elevadas que las utilizadas en frío convencional reduciendo los riesgos por daños causados por el frío (Calvo & Candan, 2018; Siddiqui, 2015).

La **atmósfera modificada** (AM) es al almacenamiento en cualquier atmósfera con un contenido gaseoso diferente al del aire (21% de O₂ y 0,03% de CO₂), pudiéndose reemplazar por otra mezcla gaseosa o alterarse en el interior de un envase mediante la respiración de los frutos (Calvo & Candan, 2018). La atmósfera gaseosa cambia continuamente durante el período de almacenamiento por la influencia de diferentes factores como la respiración del producto envasado, cambios bioquímicos y la lenta difusión de los gases a través del envase. El envase en AM reduce el paso de O₂ hacia el producto, lo que provoca un incremento en los niveles de CO₂ dentro del envase; también evita que se almacene humedad en la superficie y absorbe gases como el etileno (Siddiqui, 2015).

2 Pérdidas en postcosecha en frutas de pepita

Después de la cosecha, los frutos frescos son susceptibles de ser atacados por patógenos saprófitos o parásitos, debido a su alto contenido en agua y nutrientes, además han perdido la mayor parte de la resistencia intrínseca que los protege durante su desarrollo en el árbol. Las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades de postcosecha representan actualmente uno de los principales problemas de la fruti-horticultura mundial (Gramisci, 2019; Lutz, 2015; Harvey, 1978). La reducción de las unidades consumibles es la pérdida por las enfermedades de postcosecha. Otros aspectos que no se tienen en cuenta son: costos de acondicionamiento, transporte y reempaque (Janisiewicz, 1996).

Las mayores pérdidas en postcosecha se producen por enfermedades ocasionadas por patógenos fúngicos de diversos géneros (*Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*, entre otros). Estas pérdidas varían en función de la zona de producción, de la especie, cultivo, edad del árbol, de las condiciones climáticas, así como también del manejo pre y postcosecha (heridas y daños durante la cosecha y transporte), efectividad de los tratamientos fungicidas y la conservación (Smilanick et al., 2006). En la región del AVRNYN alcanzan un 5% y en casos extremos, las afecciones producidas por hongos pueden llegar a afectar hasta un 25% de la producción de frutas de pepita (Di Masi & Colodner, 2010). En general, las variedades de mediana a la larga conservación, como Beurrè D´Anjou y Packham´s Triumph, son las que presentan mayores problemas por enfermedades de origen fúngico.

2.1 *Penicillium expansum*

La podredumbre producida por *Penicillium expansum* (Figura 3), es la enfermedad postcosecha más importante en manzanas y peras en nuestro país y en todo el mundo (Xu & Berrie, 2005). El inicio de la enfermedad se caracteriza por la aparición de una mancha de color marrón clara, blanda y acuosa, que se desarrolla rápidamente, en la cual el tejido afectado se separa fácilmente del sano. En general comienza a desarrollarse a partir de una herida no cicatrizada sobre la cual se manifiesta la presencia del hongo, primero el micelio de color blanco, que va cambiando de color hasta adquirir la coloración azul característica que le da el nombre a la enfermedad, denominada “moho azul” (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 herida. Sin embargo, los frutos infectados producen numerosas esporas que se diseminan fácilmente por las cámaras y facilitan la dispersión del moho (Mondino, 2009).

A diferencia de otras especies, 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.

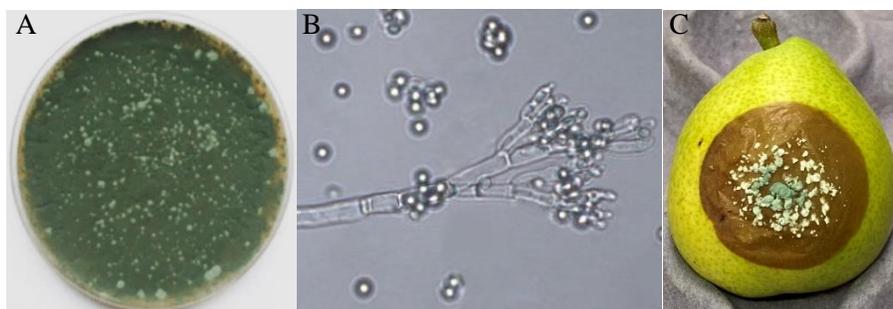


Figura 3. (A) Crecimiento *P. expansum* en medio agar papa. (B) Conidióforo de *P. expansum* aumento 400X. (C) Enfermedad causa por el moho azul en peras del varietal Beurré D'Anjou.

2.2 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea (Figura 4), 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 conocida comúnmente como “podredumbre gris”.

La podredumbre es de color marrón pálido, con una textura firme y márgenes difusos, y el tejido macerado se oscurece a medida que pasa el tiempo hasta alcanzar la coloración gris que le da el nombre. En la zona afectada se puede observar el desarrollo de micelio de color blanco, en condiciones favorables de temperatura y humedad, puede esporular y volverse de color gris. El micelio o las esporas salen a menudo de las lenticelas del fruto y forman una pelusa de color gris característica. Este moho también se caracteriza por infectar a los pedúnculos de los frutos.

La podredumbre puede llegar a afectar a todo el fruto, y los sanos en contacto pueden ser infectados formando nidos de frutos podridos. A nivel microscópico, se observan hifas ramificadas muy características y de morfologías mayoritariamente elipsoidales y globosas. Presenta una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre los 22 y los 25°C, no obstante, el crecimiento del micelio puede producirse incluso a 0°C y requiere presencia de altas humedades para llevar a cabo el proceso de infección.

Las esporas se pueden dispersar con el viento o con las gotas de agua de la lluvia. Para iniciar la enfermedad, requiere de una vía de entrada, como las heridas producidas en campo durante la cosecha y/o el posterior manejo. Por lo tanto, es muy importante evitar golpes y la formación de heridas durante la cosecha y la posterior manipulación en la central.

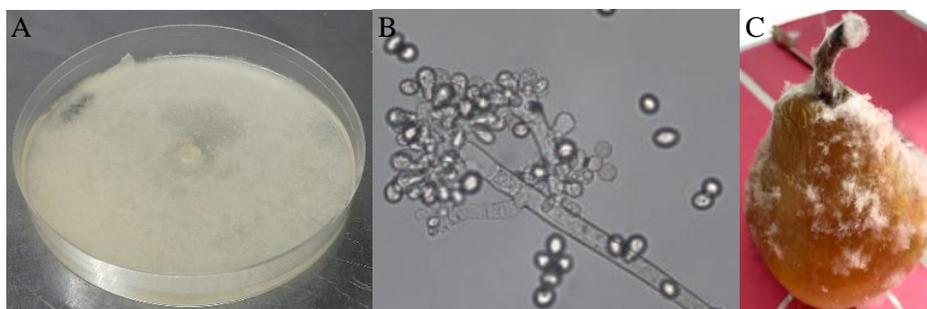


Figura 4. (A) Crecimiento *B. cinerea* en medio agar papa. (B) Conidióforo de *B. cinerea* aumento 400X. (C) Enfermedad causa por el moho gris en peras del varietal Packham's Triumph.

2.3 Proceso de infección

Los principales factores ambientales que predisponen el inicio y desarrollo de las enfermedades postcosecha son la temperatura, la humedad y la composición del aire. *P. expansum*, *B. cinérea*, así como también *Alternaria-Cladosporium* spp., 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 & 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). Debido a que son patógenos que ingresan esencialmente a través de las heridas, los daños que se producen en los frutos durante o después de la cosecha son la principal causa de podredumbres. Sin embargo, también pueden causar podredumbres a través de la infección por las lenticelas, principalmente en fruta demasiado madura, o cuando las lenticelas han sido dañadas (Snowden, 2010). Cuando las esporas de un hongo llegan a la superficie de un fruto y encuentran condiciones óptimas, pueden germinar y desarrollar la infección en un tiempo relativamente corto, desde unas pocas horas hasta algunos días. Un solo conidio sería capaz de iniciar una infección y desarrollar una podredumbre, sin embargo, esto en general no ocurre debido a las condiciones de resistencia propias de la fruta, a la temperatura y a la humedad (Nunes, 2001; Sommer, 1985).

3 Manejo de enfermedades postcosecha

En el AVRNyN los principales patógenos de postcosecha 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 bines 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 atmosferas (AC o AM).

Las pérdidas en postcosecha por patógenos de heridas se deberían reducir llevando de manera adecuada las practicas 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.

3.1 Aplicación de fungicidas de síntesis química

La aplicación de fungicidas en postcosecha es de carácter preventivo y su objetivo es proteger a la fruta de la acción de los patógenos. Esta práctica se basa en la aplicación de un principio activo que asegure la protección de la fruta durante todo el periodo que esta se encuentra almacenada. Según el mercado comprador, existe un número restringido de principios activos autorizados con un límite máximo de residuos (LMR) presentes en la fruta. En la Tabla 1, se observan los principios activos permitidos para ser usados en postcosecha de pera con los LMR permitidos según destino para la temporada de producción 2022-2023.

Los fungicidas de síntesis continúan siendo el método más utilizado debido fundamentalmente a su relativo bajo costo, facilidad de aplicación y efectividad. Dada la utilización masiva de los mismos, y en muchos casos la falta de conocimiento y conciencia sobre su correcto uso se han generado problemas como son la aparición de cepas resistentes, efectos carcinogénicos, teratogénicos, periodos largos de degradación y contaminación ambiental (Bautista-Baños, 2006; Romanazzi et al., 2016).

Actualmente los consumidores exigen productos más saludables y sin riesgos para el medio ambiente, esto ha conducido a la prohibición definitiva de muchos de los principios activos en los mercados compradores (Adaskaveg & Förster, 2010). En este sentido, desde hace un tiempo, las políticas gubernamentales de muchos países restringen fuertemente su uso o están reevaluando el registro de uso de moléculas ampliamente utilizadas.

Tabla 1. Límites máximos de residuos para peras y manzanas en ppm.

Grupo químico	Principio activo	Límites máximos permitidos					
		ARG		USA		UE	
		Pera	Mna.	Pera	Mna.	Pera	Mna.
Ftalimida	Captan	15	15	25	25	10	10
Benzimidazol	Carbendazim	1	1	NR	NR	0,2	0,2
	Metil tiofanato	1	1	3	2	0,5	0,5
	Tiabendazol (TBZ)	3	3	10	10	4	4
Dicarboximida	Iprodione	5	5	3	RST	0,01	0,01
Fenilpirroles	Fludioxonil	5	5	5	5	5	5
Imidazoles	Imazalil	2	2	RST	RST	0,01	0,01

Adaptada de Agon et al. (2022).NR: no registrado, aplica tolerancia cero. RST: registrado, pero sin tolerancia para peras y manzanas.

4 Control biológico postcosecha

El control biológico en postcosecha es una alternativa prometedora para lograr la reducción del uso de fungicidas de síntesis química para 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 término control biológico (CB) fue utilizado por primera vez por Smith, (1919) 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 concreto, el uso de microorganismos seleccionados como agentes de

biocontrol (ACB) fue introducido posteriormente por Baker & Cook, (1974) que definieron el biocontrol como “la reducción de la presencia de patógenos o de las actividades de la enfermedad mediante la introducción de uno o más organismos antagonistas”. Por otro lado, Mukerji, (1988) lo definen como “la manipulación directa o indirecta por parte del hombre, de los agentes vivos que, de forma natural, tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca un incremento de su capacidad de inhibición de las enfermedades”.

En el sector agroalimentario (*Dictionnaire d'agroécologie*), el biocontrol se refiere a un conjunto de estrategias emergentes que son alternativas al uso de productos químicos para mitigar las enfermedades en frutas y hortalizas (Zhang et al., 2020). Los microorganismos seleccionados o ACB con actividad antagonista frente a otros microorganismos, permiten reducir el uso de pesticidas (Wilson & Wisniewski, 1989) y potenciar la calidad y seguridad de los alimentos (Rodríguez-Navarro et al., 2011). Por otro lado, la relación biológica entre los ACB y los patógenos es bastante específica, de tal forma que se debe buscar un método de control para cada enfermedad.

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.

La identificación, desarrollo y comercialización de un producto de biocontrol es un proceso largo y costoso (Di Canito et al., 2021; Droby et al., 1998; Nunes, 2012). Todo este proceso puede dividirse en dos fases principales: descubrimiento y desarrollo comercial (Figura 5).

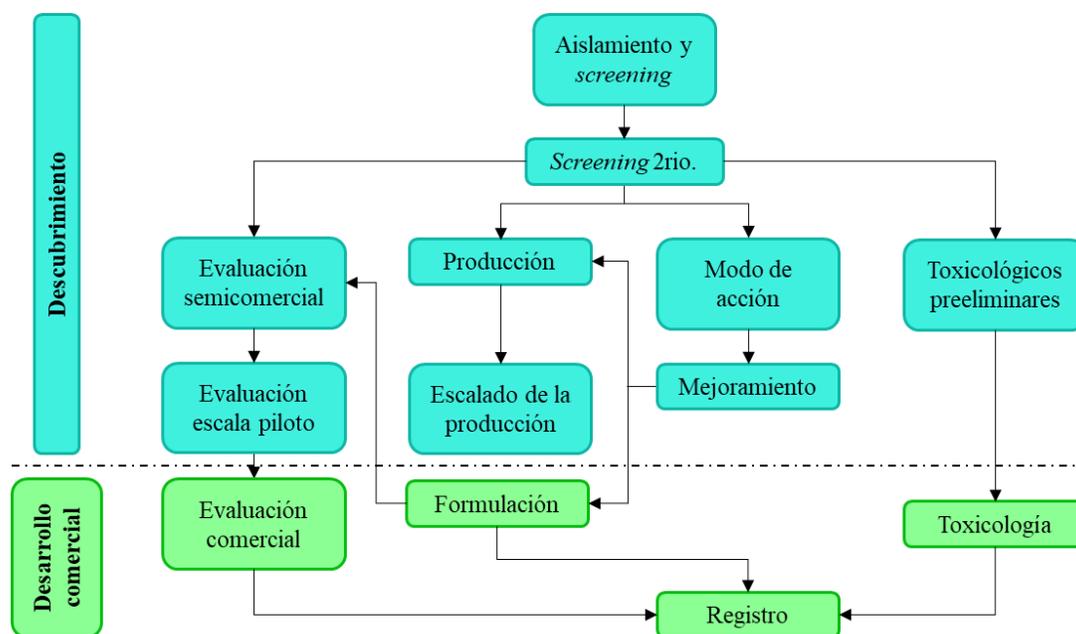


Figura 5. Diagrama de flujo de las etapas que implican el desarrollo de un ACB postcosecha (Nunes, 2012).

La primera etapa, debe considerar desde el aislamiento en el laboratorio hasta las pruebas de eficacia a escala laboratorio y semicomercial, a fin de evaluar su comportamiento frente a diferentes patógenos y la compatibilidad con las prácticas postcosecha. El estudio de los mecanismos de acción del ACB, los requerimientos nutricionales y metodologías para mejorar su actividad antagonica también se incluyen en esta etapa (Nunes, 2012).

La segunda etapa incluye el desarrollo y la evaluación comercial del ACB, es decir la producción a gran escala, el desarrollo de un producto formulado, la bioseguridad del microorganismo y el registro/patentamiento (Nunes, 2012). Es importante conocer en detalle varios factores que influyen en la incidencia de las enfermedades postcosecha: tipo de patógeno, hospedador, epidemiología de la enfermedad, resistencia del hospedador y las condiciones ambientales en las que se utilizará y producirá el ACB.

En la Tabla 2, se muestran algunos productos comerciales disponibles actualmente en el mercado. El número reducido de biofungicidas disponibles a nivel mundial es escaso ya que los procesos de registro son complicados, lentos y caros. Para registrar un ACB, la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente), encargada de la regulación de los agentes de control biológico en EE.UU. necesita unos dos años, mientras que en Europa el registro de los mismos productos tarda casi siete años.

Tabla 2. Microorganismos antagonistas formulados comercialmente.

Microorganismo	Nombre comercial	Patógeno blanco	Fruta
<i>Candida oleophila</i>	Nexy	<i>Botrytis, Penicillium.</i>	Pera, manzana, cítricos, plátano.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Romeo	<i>B. cinerea, Erysiphe.</i>	Uva, lechuga, tomate, frutilla, pepino.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Botector	<i>E. amylovora, B. cinerea, Colletotrichum gloeosporioide.</i>	Uva, frutilla, tomate.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Blossom Proctect	<i>B. cinerea, Erwinia amylovora, Neofabraea spp., Monilia fructigena, P. expansum.</i>	Pera, manzana, membrillo.

Adaptado de (Kowalska et al., 2022; Zhang et al., 2020).

Como ACB para el control de *P. expansum* y *B. cinerea* en frutas de pepitas (peras y manzanas) se conocen numerosas levaduras con capacidad antagonista, pero no están hasta el momento disponibles como productos en el mercado de agroinsumos. Algunos ejemplos son: *Candida sake* (Viñas et al., 1998), *Candida saitoana* (El-Ghaouth, Smilanick, & Wilson, 2000), *Cryptococcus albidus* (Robiglio et al., 2011), *Cryptococcus laurentii* (Zhang et al., 2007), *Leucosporidium scottii* (Vero et al., 2011), *Metschnikowia andauensis* (Manso & Nunes, 2011), *Metschnikowia pulcherrima* (Piano et al., 1997; Spadaro et al., 2002), *Pichia membranifaciens* (Lutz et al., 2020; S. Tian et al., 2004; X. Xu et al., 2008), *Vishniacozyma victoriae* (Gorordo et al., 2022; Lutz et al., 2020), *Rhodotorula aurantiaca* (Chand-Goyal & Spotts, 1996), *Rhodotorula glutinis* (Zhang et al., 2008), *Rhodosporidium*

paludigenum (Sun et al., 2018; Wang et al., 2011) y el hongo similar a levaduras o *yeast-like Aureobasidium pullulans* (Zajc et al., 2020).

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 & Droby, 2016; Zhang et al., 2020) ya que cumplen con los requisitos necesarios y muchas de ellas son consideradas organismos seguros o GRAS (siglas en inglés Generally Recognized As Safe).

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 & 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 (Jamalizadeh et al., 2011; Zhang et al., 2020; Lutz et al. 2013). Algunos de los mecanismos más estudiados son: competencia por nutrientes y espacio, amensalismo y parasitismo, inducción de resistencia en el hospedador, producción de *biofilm* y *quorum sensing* (Di Canito et al., 2021; Nunes, 2012; Spadaro & Droby, 2016; Verma et al., 2022; Zhang et al., 2020a).

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 (Nunes, 2012; Spadaro & Droby, 2016). 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 & Chalutz, 1994).

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).

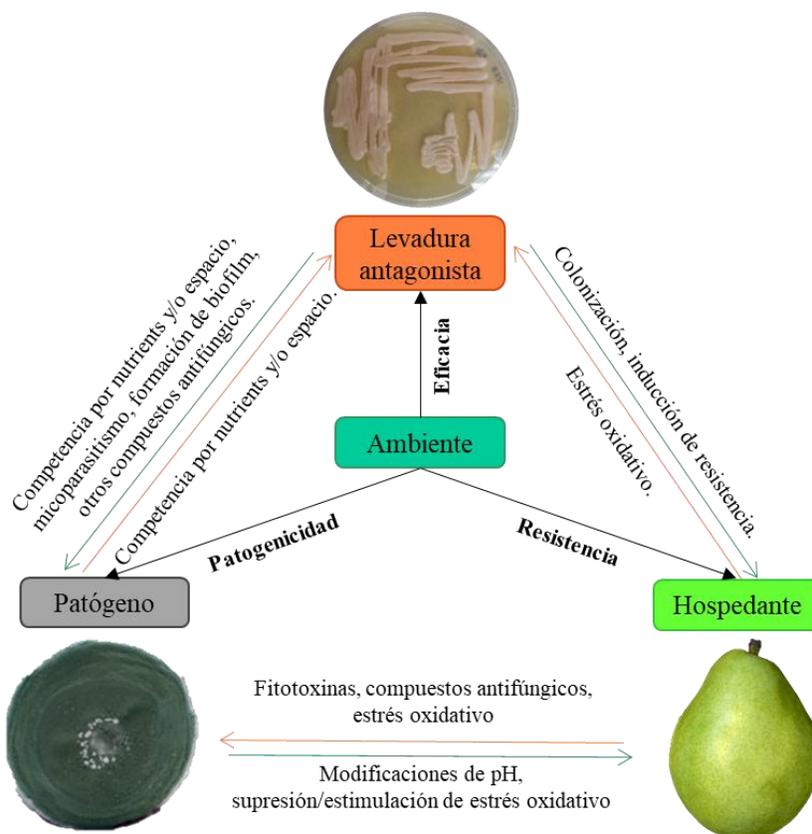


Figura 6. Esquema de las posibles interacciones entre los componentes del sistema de biocontrol: patógeno, levadura antagonista, hospedante y ambiente (Zhang et al., 2020).

4.2 Mejoramiento de la acción biocontroladora de los ACB

Si bien muchos estudios han informado sobre los mecanismos de biocontrol de las levaduras antagonistas, los mecanismos específicos aún requieren de una mayor clarificación (Öztekin & Karbancioglu-Guler, 2023; Zhang et al., 2020). En comparación con los fungicidas químicos, las levaduras antagonistas aún deben mejorarse en muchos aspectos, lo que también limita su comercialización y aceptación en el mercado. El uso combinado de control biológico y métodos físicos o químicos es una forma eficaz de

mejorar la eficacia del biocontrol. Se han evaluado diversos métodos para mejorar el control biológico en enfermedades postcosecha.

4.2.1 Adición de sales inorgánicas

La adición de sales inorgánicas en los tratamientos postcosecha mejoran la actividad controladora de los ACB (El-Ghaouth et al., 2004; Sharma et al., 2009). Dentro de las sales evaluadas se destacan: cloruro de calcio, propionato de calcio, carbonato y bicarbonato de sodio, metabisulfito de potasio, etanol y molibdato de amonio (Cao et al., 2010; Conway et al., 2007; Csutak et al., 2012; Gholamnejad & Etebarian, 2009; Janisiewicz et al., 2008; Torres et al., 2007). Estos compuestos están clasificados como GRAS, lo cual presentan una ventaja al momento de afrontar una estrategia que permita mejorar la actividad antagonista de las levaduras (Nunes, 2012).

Estos compuestos tienen efectos directos sobre el patógeno (actividad fungistática y fungicida) ya que estimulan la actividad antagonista y despiertan la resistencia de la fruta (Gramisci et al., 2018). Al combinar ACB con estos compuestos se debe tener en cuenta que la efectividad de los antagonistas depende de: la concentración del antagonista, la concentración de aditivo, su compatibilidad mutua, la duración y tiempo en que se apliquen. Se demostró que los aditivos, en combinación con los ACB mejoran la eficacia a niveles semejantes a los obtenidos con los fungicidas químicos (Droby et al., 2009).

4.3 Desarrollo de un ACB

El desarrollo de un bioproceso, en particular la producción de un ACB involucra una serie de pasos que deben ser llevados a cabo de manera ordenada (Figura 7), los cuales implican distintos tipos de conocimientos científicos (Doran, 2013). La producción de biomasa de un ACB es además un paso esencial en el proceso de comercialización y los resultados obtenidos son decisivos para el desarrollo comercial del producto (Nunes, 2012).

El primer paso consiste en el aislamiento y *screening* de microorganismos capaces de actuar como ACB. Este paso es muy importante ya que determina la eficacia de los ACB que se seleccionarán y tiene un impacto directo sobre las especies aisladas y sobre el mecanismo de acción de los antagonistas (Droby et al., 2009; Nunes, 2012). Los microorganismos aislados son obtenidos en estado puro y evaluados individualmente en

bioensayos sobre frutos (Figura 7, etapa 2). Esta estrategia permite la rápida selección de los posibles antagonistas con un costo mínimo de tiempo y dinero. Durante esta etapa, es importante tener en cuenta que tanto el aislamiento de los microorganismos, como los bioensayos se deben realizar a la temperatura de conservación de la fruta. Otro aspecto a tener en cuenta, es desarrollar una estrategia que utilice cepas de patógenos locales. Una estrategia de aislamiento innovadora, propuesta por Sangorrín et al. (2014) y Lutz et al. (2012), fue almacenar frutas heridas durante 6 meses en cámara fría. Transcurrido este tiempo, el agua de lavado (AL) de la superficie de los frutos sanos y el AL de las heridas sin signos de podredumbres, se utilizan como fuentes de aislamiento de potenciales ACB.

En bioensayos *in situ* las frutas sanas son lavadas y heridas, en ellas se inocula AL junto con esporas del patógeno conocido y luego son nuevamente almacenadas. Aquellas AL que presenten una reducción del 50% en la incidencia de la enfermedad luego de 50 días de conservación, se seleccionan para el aislamiento de levaduras. El aislamiento se lleva a cabo en placas agar jugo de pera a baja temperatura, como presión selectiva para potenciar el desarrollo de levaduras de crecimiento lento y adaptadas a la composición química de la fruta. Por último, en bioensayos *in situ* de las levaduras aisladas individualmente se evalúan frente a los patógenos en condiciones de almacenamiento en frío durante varios meses. A partir de estos segundos bioensayos, se seleccionan aquellas que muestran una reducción superior al 80% en la incidencia de las enfermedades.

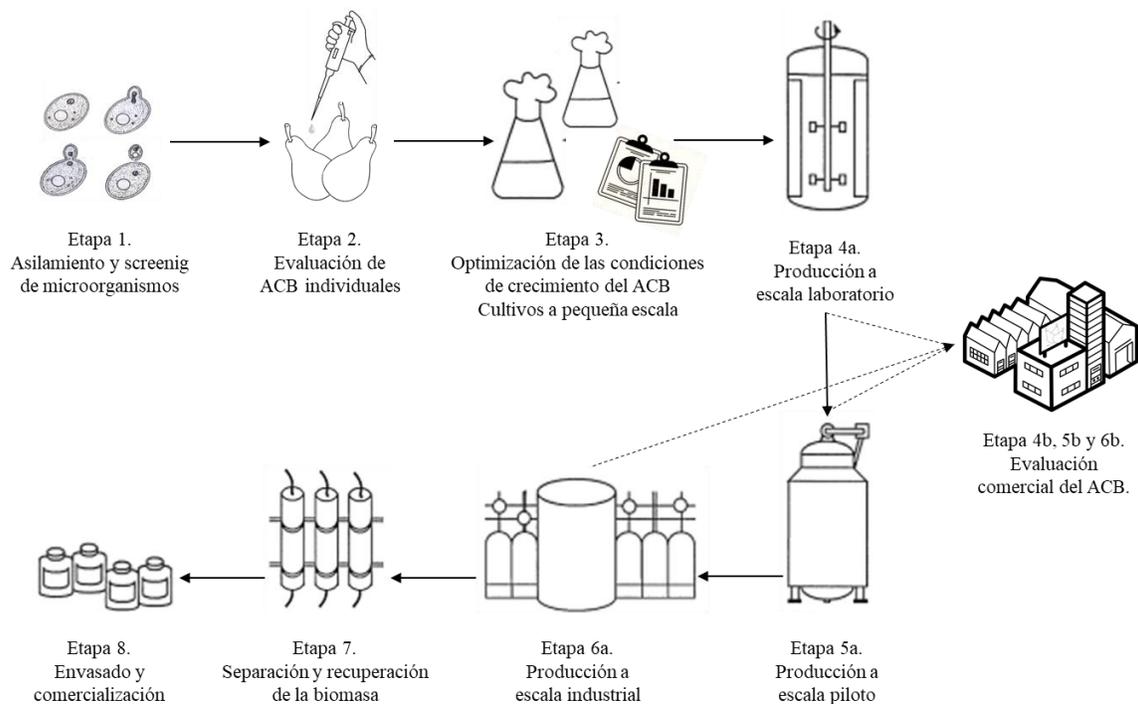


Figura 7. Desarrollo de un bioproceso para la producción de un ACB (adaptado de Doran 2013).

Una vez aislado el potencial ACB, se deben determinar las características de crecimiento y producción de las células, para definir un medio de cultivo (Figura 7, etapa 3). Se evalúan diferentes composiciones del medio de cultivo, pH, temperatura de crecimiento, velocidad de agitación, entre otros. Se llevan a cabo diseños estadísticos de experimentos, en donde se realizan cultivos a pequeña escala (100-1000 mL) variando las condiciones anteriormente mencionadas. En esta etapa, los parámetros calculados, como velocidad específica de crecimiento, productividad y el rendimiento de biomasa, se utilizan para describir el rendimiento de la producción de biomasa del microorganismo. Una vez conocidas las condiciones de cultivo para la producción, se inicia el escalado del proceso.

El primer paso en el escalado es a nivel laboratorio (o banco) (Figura 7, etapa 4), se utilizan biorreactores de 1-10 L, equipados para monitorear y ajustar todas las variables del proceso, como sensores de pH, temperatura, oxígeno disuelto, espuma, bombas dosificadoras de antiespumante, ácidos y bases, medio de cultivo fresco, agitadores, placas contracorrientes (*baffles*), etc. Lo más importante es que el reactor pueda proveer las condiciones para un crecimiento óptimo del microorganismo. El escalado a este nivel se lleva a cabo mediante el cálculo de parámetros como: el coeficiente de transferencia de

oxígeno (k_La), la potencia del agitador, la tasa de disipación de energía, entre otros. En esta etapa también es importante definir el mejor proceso de producción: discontinuo, semicontinuo, continuo o alimentado, teniendo en cuenta los valores de viabilidad, rendimiento y productividad obtenidos en cada proceso de producción (Doran, 2013; Shuler & Kargi, 2002).

Finalizada esta etapa, se aumenta el volumen de producción a escala piloto (Figura 7, etapa 5). Se utilizan biorreactores con 100-1000 L de capacidad. El biorreactor a escala piloto debe ser similar al que se empleó a escala laboratorio. El escalado se lleva a cabo teniendo en cuenta el principio de similitud geométrica y para el caso de procesos aeróbicos el principal parámetro tenido en cuenta es k_La . El objetivo de los estudios a escala piloto es examinar la respuesta de las levaduras al aumento de escala. Cambiar el tamaño del equipo parece un proceso sencillo; no obstante, a menudo se producen pérdidas o variaciones de rendimiento. Aunque la geometría del reactor, el diseño del agitador, el método de aireación y otras características puedan ser similares en ambos reactores, el efecto del escalado sobre la producción de biomasa puede ser grande (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009; Vieira et al., 2013).

Cuando el escalado a planta piloto se realiza de manera satisfactoria, comienza el diseño de la producción a escala industrial (Figura 7, etapa 6). El biorreactor y cada uno de sus componentes deben diseñarse de manera correcta, así como también deben diseñarse y probarse todas las instalaciones auxiliares: equipos de aireación, sistema de esterilización, generador de vapor, suministro de agua de refrigeración y de red, entre otros (Doran, 2013).

Una parte importante del proceso total es la recuperación del producto (Figura 7, etapa 7), también conocida como procesamiento posterior o *downstream*. Esta etapa se lleva a cabo una vez que la biomasa comienza su fase estacionaria de crecimiento dentro del reactor. La biomasa junto con el medio de cultivo agotado, se extraen del reactor para separar la biomasa del medio de cultivo. La recuperación de las levaduras suele ser un proceso difícil y costoso. Los métodos más utilizados para levaduras son filtración (Patiño-Vera et al., 2005), centrifugación o, en algunos casos, la floculación (Teixidó et al., 2022). En todos los casos se debe comprobar la viabilidad de las levaduras luego de ser sometidas a estos tratamientos de separación y secado. También debe tenerse en cuenta la eliminación del medio de cultivo tras la separación de las levaduras. Muchas operaciones habituales en

el laboratorio resultan muy costosas o poco prácticas a escala 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).

Una vez obtenida la cantidad de biomasa suficiente, el producto está listo para ser envasado y comercializado (Figura 7, etapa 8). En distintas etapas del desarrollo del producto (Figura 7, etapas 5b, 6b, 7b), se deben realizar pruebas para verificar la capacidad antagonista del ACB sobre los fitopatógenos de la fruta hospedadora. Estas pruebas deben realizarse a gran escala y/o en condiciones comerciales, evaluando tanto los ACB frescos como secos. Las pruebas en condiciones comerciales implican una gran cantidad de fruta y por lo tanto una gran cantidad de biomasa (Nunes, 2012; Torres et al., 2007). Sólo después de que se hayan llevado a cabo estos ensayos y se haya establecido la efectividad y seguridad del producto, se puede registrar/patentar para su comercialización.

4.3.1 Cultivos por lotes o *batch*

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 & 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.

4.3.2 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, por lo tanto, la productividad volumétrica de estos cultivos puede aumentarse mediante 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. En este tipo de cultivo, las células permanecerán en fase exponencial mientras se alimente el reactor con medio de cultivo fresco, sin alcanzar el estado estacionario hasta que el reactor deje de ser alimentado con medio fresco. 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).

4.3.3 Escalado de la producción de biomasa

El diseño de bioprocesos a escala industrial suele basarse en el rendimiento de prototipos utilizados a pequeña escala. Siempre es mejor saber si un determinado proceso funcionará correctamente a pequeña escala, antes de realizarlo en tamaño real. Determinar las condiciones óptimas de funcionamiento a escalas de gran tamaño es costoso y lleva mucho tiempo. Lo ideal es que el escalado se lleve a cabo de modo que las condiciones en el recipiente grande sean lo más parecidas posibles a las que producen buenos resultados a una escala laboratorio o banco (Doran, 2013; Shuler & Kargi, 2002).

Sin embargo, el cambio de escala es un proceso intrínsecamente complicado debido a que mientras los fenómenos termodinámicos y micro-cinéticos son independientes de la escala, los fenómenos de transporte son dependientes de la escala (García-Ochoa & Gómez, 2009; Vieira et al., 2013). Esto tiene importantes consecuencias en las características del ambiente donde se desarrollan las levaduras. Por ejemplo, a pequeñas escalas, los gradientes de concentración y presión son casi nulos. A escalas de producción industrial, estos gradientes son significativamente mayores (Crueger et al., 1989). Cuando las levaduras circulan a través del reactor se encuentran con presiones, esfuerzos de corte y concentraciones de nutrientes y oxígeno que cambian continuamente. Estos fenómenos afectan profundamente el comportamiento y viabilidad de las levaduras obtenidas (Pérez-Torrado et al., 2015). La utilización de técnicas de análisis dimensional suele proporcionar un cierto grado de conocimiento y guía para el diseño y cambio de escala de biorreactores (Hewitt & Nienow, 2010). El análisis dimensional es una técnica en la cual grupos adimensionales de parámetros se mantienen constantes durante el escalamiento. Existen reglas heurísticas de escalamiento que surgen de la experiencia práctica en fermentaciones industriales.

En este sentido, los biorreactores deben cumplir con ciertas especificaciones geométricas de manera que se pueda llevar a cabo un proceso eficaz, eficiente, sin complicaciones y obteniendo el mayor rendimiento y productividad posible. Uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de realizar escalado, es el principio de similitud geométrica, en donde estas especificaciones se deben cumplir tanto en el reactor prototipo como en el reactor a escala piloto/industrial. La Figura 8 muestra las especificaciones geométricas de un tanque agitado y en la Tabla 3 se detallan los rangos de estas especificaciones.

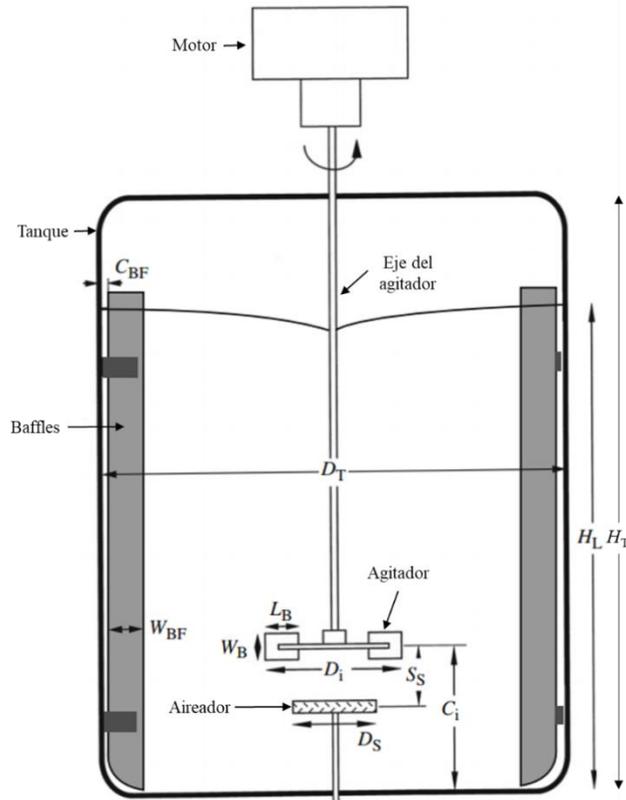


Figura 8. Especificaciones geométricas de un reactor de tipo tanque agitado. C_{BF} : distancia entre baffle y pared del tanque; W_{BF} : ancho de baffle; W_B : ancho del agitador; L_B : longitud del agitador; D_i : diámetro del agitador; S_s : distancia entre el aireador y el agitador; C_i : distancia entre el agitador y el fondo del tanque; D_s : diámetro del aireador; H_L : altura del líquido; D_T : diámetro del tanque; H_T , altura del tanque.

Para los fermentadores a escala industrial, el suministro de oxígeno y transferencia de oxígeno, son las principales limitaciones de diseño. Las necesidades de oxígeno dependen de cada microorganismo y la transferencia de oxígeno, en particular el $k_L a$, depende del reactor, del medio de cultivo y la temperatura. Si bien, $k_L a$ es un parámetro difícil de predecir, es un parámetro que se puede medir (Figura 9). Existen cuatro métodos para su medición: estado inestable, estado estacionario, dinámico y ensayo con sulfito (Shuler & Kargi, 2002). La forma de aplicar estos métodos depende de si la determinación se realiza en un sistema con presencia o ausencia de microorganismos. El método dinámico, es uno de los métodos más sencillos, económicos y ampliamente utilizado a escala laboratorio. Se realiza cuando las levaduras dentro del fermentador se encuentran en fase exponencial de crecimiento y solo requiere un sensor de oxígeno disuelto y registrador de datos o gráficos. Este método requiere que el suministro de aire se cierre durante un breve período (generalmente menor a 5 min) hasta que se alcance la concentración crítica de oxígeno

disuelto (aproximadamente 20%) y a continuación, se vuelve a conectar hasta que se reestablezca la concentración de oxígeno y se mantenga constante (Figura 9). Luego, mediante una serie de cálculos matemáticos y análisis gráficos, es posible determinar el valor de $k_L a$ para las condiciones de cultivo a las cuales fue determinado. El $k_L a$ debe mantenerse constante para llevar a cabo un correcto escalado, parámetro fundamental en el caso de cultivos aeróbicos.

En resumen, el escalado es un proceso completamente empírico y sólo tiene sentido si no hay cambios en el régimen de control y producción de la biomasa durante el escalado.

Tabla 3. Rango de valores de especificaciones geométricas.

Relación	H_T/D_T	L_B/D_i	D_i/D_T	W_B/D_i	H_L/D_T	W_{BF}/D_T	D_i/C_i	C_i/D_T
Valor	[2; 3]	0,25	[0,25; 0,5]	0,2	[1; 1,25]	[0,08; 0,1]	1	[0,16; 0,5]

H_T , altura del tanque; D_T : diámetro del tanque; L_B : longitud del agitador; D_i : diámetro del agitador; W_B : ancho del agitador; H_L : altura del líquido; W_{BF} : ancho de baffle; C_i : distancia entre el agitador y el fondo del tanque.

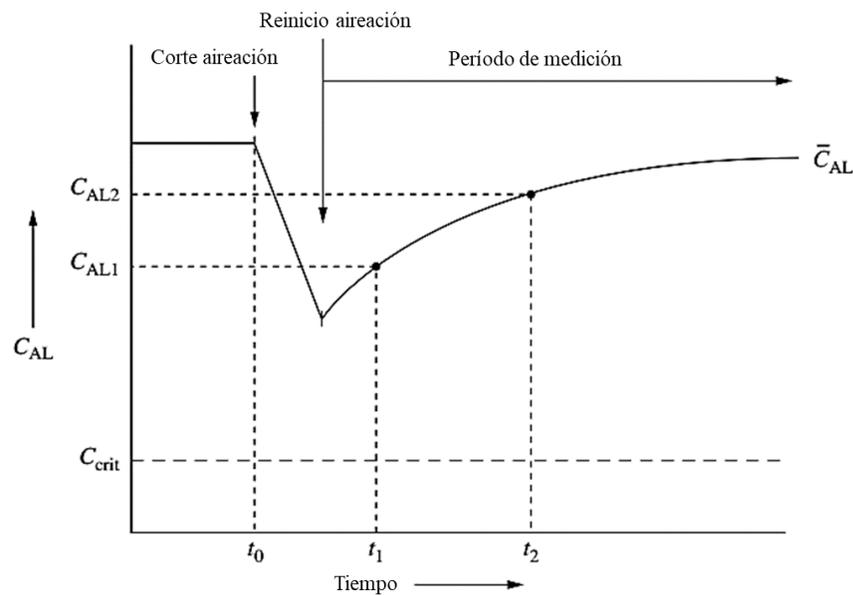


Figura 9. Variación de la concentración de oxígeno disuelto para la medición mediante el método dinámico de $k_L a$.

4.4 Factores que influyen en el proceso de producción

Para la producción de biomasa de levaduras deben ser considerados varios aspectos relacionados con su crecimiento y reproducción, que incluyen factores nutricionales

relacionados con el medio de cultivo y factores físicos relacionados con las condiciones de cultivo.

4.4.1 Factores nutricionales

Los requerimientos de nutrientes se pueden clasificar, de acuerdo a la demanda por parte de los microorganismos, en dos tipos: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son los compuestos requeridos en grandes cantidades, por lo que son el compuesto mayoritario en los medios de cultivo. Los macronutrientes más importantes son el carbono y el nitrógeno, compuestos mayoritarios en el medio de cultivo (Schnierda et al., 2014). Otros que se necesitan en menor proporción son fósforo, azufre, potasio y magnesio, que generalmente se incorporan a los medios en forma de sales. Los micronutrientes, también denominados elementos trazas incluyen vitaminas, principalmente biotina, tiamina, ácido pantoténico e inositol y minerales esenciales para el crecimiento de los microorganismos como hierro, manganeso, calcio, zinc y cobalto (Liu et al., 2017).

4.4.1.1 Carbono

La fuente de carbono tiene un doble papel en la producción de biomasa y la generación de energía, siendo los carbohidratos la fuente más frecuente para estos procesos. Las levaduras son capaces de utilizar monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, el uso de polisacáridos es posible solo después de ser hidrolizados en el interior o exterior celular (Kurtzman et al., 2011). En el caso de los disacáridos, como la lactosa y la sacarosa, se deben hidrolizar primero para que los monosacáridos resultantes puedan ser metabolizados por las levaduras. Aproximadamente un 50% de la composición elemental de los microorganismo es carbono (Doran, 2013), es por eso que se necesitan grandes concentraciones para llevar a cabo la producción de biomasa.

4.4.1.2 Nitrógeno

El nitrógeno puede ser inorgánico, como las sales de amonio, u orgánico, como los aminoácidos, las proteínas o la urea (Costa et al., 2002). El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Representa el 14% de la composición elemental de los microorganismos, por lo que, seguido del carbono, el nitrógeno también es necesario en grandes concentraciones. Muchas levaduras pueden

también asimilar péptidos y proteínas, que son hidrolizados a aminoácidos como la arginina, ácido glutámico, prolina, entre otros por medio de proteasas producidas por ellos mismos.

4.4.2 Factores físicos

4.4.2.1 Oxígeno

El oxígeno es un componente esencial en el crecimiento de las levaduras. En el metabolismo aeróbico el O₂ actúa como último aceptor de electrones, siendo este proceso clave para la generación de energía (ATP).

La solubilidad del oxígeno en soluciones acuosas a temperatura y presión ambiente es inferior a 10 ppm. Esta cantidad de oxígeno se consume rápidamente en los cultivos aeróbicos y debe suministrarse constantemente al medio de cultivo, utilizando dispositivos de aireación y a través de la agitación. Una población celular en crecimiento exponencial puede consumir todo el contenido de oxígeno del medio de cultivo en pocos segundos. Por lo tanto, la cantidad máxima de oxígeno que puede disolverse en el medio debe transferirse desde la fase gaseosa de 10 a 15 veces por minuto a la fase líquida. La tasa de transferencia de oxígeno del gas al líquido es muy importante, especialmente en cultivos celulares densos donde la demanda de oxígeno disuelto es elevada (Shuler & Kargi, 2002).

La velocidad a la que las células consumen el oxígeno en los fermentadores determina la velocidad a la que debe transferirse el oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida. Muchos factores influyen en la demanda de oxígeno. Los más importantes son: el microorganismo, la fase de crecimiento del cultivo y la naturaleza de la fuente de carbono utilizada.

4.4.2.2 Temperatura

La temperatura afecta la velocidad específica de crecimiento, los requerimientos nutricionales, la composición química de las células y la transferencia de oxígeno. La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras es de alrededor de 25-30°C; sin embargo, el rango está comprendido entre 5°-37°C (Kurtzman et al., 2011). Cuando la temperatura de cultivo no es la adecuada para el microorganismo que se desea producir, su crecimiento se ve notablemente afectado. La temperatura óptima de crecimiento es en la

cual su velocidad específica de crecimiento es máxima. La necesidad de mantener la temperatura de cultivo en el valor óptimo hace que los biorreactores cuenten con dispositivos apropiados para tal fin.

4.4.2.3 Inóculo

Las condiciones en las que se encuentra el inóculo es el factor más importante para la óptima producción de un microorganismo a escala de reactor. Debe estar en estado puro, libre de contaminaciones y activo metabólicamente para reducir la fase *lag* dentro del reactor. Para minimizar la duración de la fase de latencia, las células deben estar adaptadas al medio y a las condiciones de crecimiento antes de la inoculación, por estas razones es adecuado que el inóculo se encuentre en fase exponencial de crecimiento. La edad del cultivo del inóculo también tiene un fuerte efecto sobre la duración de la fase *lag*, normalmente el periodo de latencia aumenta con la edad del inóculo. En general el inóculo se obtiene mediante un pie de cuba, que corresponde a un escalado de menor a mayor volumen del microorganismo a producir. El tamaño del inóculo debe ser entre un 5% y un 10% del volumen de cultivo del reactor (Shuler & Kargi, 2002).

4.5 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 (Zabriskie et al., 1980). 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 & 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, como azúcares asimilables, son los granos, melazas, celulosas, suero de queso fresco o en polvo, mosto de uva y 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 et al., 2002).

4.5.1 Suero de queso

El suero de queso (SQ) es el principal subproducto de la industria láctea, definido como la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche durante la elaboración de queso (Foegeding & Luck, 2002, CAA, 2023). El suero de queso se obtiene luego de la separación de las caseínas y de la grasa como resultado de una coagulación, donde estos componentes precipitan y se disgregan del resto de la leche. Se compone principalmente de agua, pero también contiene alrededor del 50% de los sólidos de la leche. La fracción de materia seca retiene la mayor parte de la lactosa (66-77% p/p), 8-15% p/p de proteínas globulares y un 7-15% p/p de sales minerales (Carvalho et al., 2013; Lievore et al., 2015).

La producción de leche bovina en la Argentina se concentra en la zona centro-pampeana, que abarca las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, principalmente, y en menor medida en Entre Ríos y La Pampa, alcanzando algo más de 11.000 millones de litros por año (Rozycki, 2021). El 75% de la producción de leche se destina a la elaboración de productos lácteos, y dentro de éstos el 33% corresponde a quesos, por lo cual cerca el 25% de la leche se destina a estos productos. El suero de queso o lactosuero representa aproximadamente el 85% de la leche destinada a quesos, es decir que alcanza entre 2.300 y

2.500 millones de litros por año, por lo cual su revalorización supone un muy importante aspecto económico para las industrias lácteas de la Argentina (Rozycki, 2021).

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). Tradicionalmente, el destino del suero de queso es la alimentación animal y como fertilizante. Este uso, permite 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 & Walsh, 2016).

El suero de queso en polvo (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 & Silva, 1995). Esto permite conservar la calidad del suero durante más tiempo para su transporte o manipulación posterior (Siso, 1996). La lactosa presente puede ser convertida en biomasa por numerosos microorganismos, ya que la asimilan en su metabolismo. Estos estudios se han realizado en diferentes cepas de levaduras de *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estas especies utilizan lactosa como fuente principal de carbono y energía con muy buenos rendimientos de crecimiento (Bosso et al., 2020; Farkas et al., 2019; Galvão de Souza Júnior et al., 2001; Ghaly et al., 2005; Grba et al., 2002; Mahmood, 2015; Ozmihi & Kargi, 2007c; Ryan & Walsh, 2016).

4.5.2 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. Esta última calidad de fruta 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 & 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 (MM) 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). Si bien 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.

5 Empleo de diseño estadístico de experimentos

Cuando se busca optimizar la producción de biomasa de un microorganismo es necesario desarrollar un medio de cultivo económico y adecuado que contenga la cantidad mínima y necesaria de los diferentes nutrientes. Para esto, las herramientas estadísticas son sumamente útiles, ya que permiten llevar a cabo la optimización mediante distintas estrategias.

El Diseño Estadístico de Experimentos (DEE) es una metodología basada en herramientas matemáticas y estadísticas cuyo objetivo es planear y realizar un conjunto de pruebas que permitan generar datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen

evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas por el experimentador sobre determinada situación con el mínimo costo (Gutiérrez Pulido, 2012).

En un DEE se manipulan intencionadamente uno o más factores vinculados a las causas que influyen en el sistema, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés. El DEE establece qué factores hay que manipular, de qué manera, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza predefinido la necesidad de una presunta relación causa-efecto. Según Ferré y Rius, (2001) la aplicación del diseño de experimentos requiere considerar las siguientes etapas:

1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo.
2. Elegir la(s) variable(s) respuesta que será medida en cada punto del diseño y verificar que se mide de manera confiable.
3. Identificar los factores que podrían influir en la función objetivo y los valores que éstos pueden tomar.
4. Establecer una estrategia experimental, llamada plan de experimentación.
5. Efectuar los experimentos con los valores de los factores decididos en el punto 3 para obtener los valores de las respuestas estudiadas.
6. Interpretar los resultados. Si es necesario, volver a la etapa 1.

El método tradicional de experimentación consiste en variar-un-factor-cada-vez (VUFVCV): dadas unas condiciones iniciales, se realizan experimentos en los cuales todos los factores se mantienen constantes excepto el que está en estudio. De este modo, una variación en la respuesta se puede atribuir a la variación de ese factor.

El método VUFVCV presenta inconvenientes importantes cuando existe interacción entre los factores ya que no informa sobre cómo un factor interactúa con los otros factores o cómo afectan a la respuesta. Por otro lado, no proporciona la posición del óptimo por lo que este método requeriría demasiados experimentos, demasiado tiempo y un aumento en los costos.

Por otro lado, el DEE proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir con la máxima eficiencia. El DEE conduce a una planificación con

menos experimentos que el método VUFCV para obtener un conocimiento equivalente, en menor tiempo y reduciendo los costos (Ferré & Rius, 2001).

5.1 Aplicación de diseños estadísticos experimentales (DEE) para la optimización de producción de biomasa

Para la aplicación de DEE se deben llevar a cabo dos grandes pasos. En primer lugar, se debe realizar un *screening*, en donde se estudian muchos factores para identificar los que tienen efectos significativos sobre las variables respuestas estudiadas. En segundo lugar, se debe realizar la optimización, en la que los factores significativos se analizan en distintos niveles para determinar las mejores condiciones (Vera Candiotti et al., 2014).

Estos pasos se llevan cabo realizando los experimentos diseñados estadísticamente, se estiman coeficientes en un modelo matemático para predecir la respuesta y luego se comprueba el ajuste del modelo. A partir del modelo matemático, pueden calcularse los niveles de los factores que dan la máxima respuesta (Vohra & Satyanarayana, 2002). Esta técnica se ha utilizado para la producción de agentes de biocontrol utilizando sustratos económicos para el medio de cultivo (Gorordo et al., 2023; Liu et al., 2017; Mishra et al., 2012; Wang et al., 2011) a través de la determinación de valores óptimos de parámetros de crecimiento como el pH, las condiciones de cultivo, el tamaño del inóculo, la concentración de carbono, nitrógeno y fósforo, entre otros (Singh et al., 2017; Vohra & Satyanarayana, 2002).

5.1.1 *Screening* de factores

Esta etapa consiste en detectar y examinar cuidadosamente todos los factores que pueden afectar al proceso, tanto negativa como positivamente y sobre los que el experimentador puede ejecutar cambios, es decir, las variables controladas. Debe definirse el dominio experimental para cada factor, como también métodos de control y medición precisos. Muchas veces, el número de factores a considerar puede ser elevado, entonces, es necesario realizar experimentos de selección que permitan determinar las variables experimentales y sus interacciones que tengan una influencia significativa en la o las respuestas analizadas (Box et al., 2005; Montgomery, 2017).

Durante el *screening* de factores, estos suelen evaluarse en dos niveles (-1, +1). Este rango es el intervalo más amplio en el que puede variar cada uno de los factores para el sistema estudiado. Estos factores se eligen en función de la información bibliográfica o de conocimientos previos. Los diseños estadísticos más utilizados para esta etapa son: diseños factoriales completos, factoriales fraccionados y Plackett-Burman (PBD), todos ellos establecen dos niveles para cada factor. Son relativamente económicos, eficaces y sencillos de llevar a cabo de manera experimental (Gutiérrez Pulido, 2012).

5.1.2 Metodología de la superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (MSR) permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellos valores exactos de los factores que dan por resultado “valores óptimos” de las variables respuestas estudiadas (Gutiérrez Pulido, 2012; Myers et al., 2016).

La forma de la función (f_x) que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es en general desconocida. Por ello el primer objetivo de la MSR consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la f_x .

Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de aproximación son los de órdenes uno y dos (Gutiérrez Pulido, 2012), que nos proporcionan los siguientes modelos:

Modelo de primer orden:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^N \beta_i \cdot x_i \quad (Ec. 1)$$

Modelo de segundo orden:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^N \beta_i \cdot x_i + \sum_{j=2}^N \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} \cdot x_i^2 \quad (Ec. 2)$$

En la construcción de modelos de superficies de respuesta, es muy común la codificación de los valores reales de los niveles de los factores, pues las distancias medidas sobre los ejes de las variables codificadas en el espacio k-dimensional se convierten en estándar. Esto facilita los cálculos que deben llevarse a cabo para obtener el modelo de

aproximación e incrementa el ajuste en la estimación de los coeficientes. Dicha codificación se realiza según:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad i = 1, \dots, N \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde x_i corresponde a la variable codificada, X_i corresponde al valor real de la variable independiente, X_0 es el valor real de la variable independiente en el punto central y ΔX_i corresponde al paso o diferencia entre los extremos y el punto central. A los extremos de cada factor le corresponderán los valores +1 y -1 mientras que el punto central asumirá el valor 0. El punto central es tomado como valor de partida para definir el rango que tomarán los factores a ser estudiados.

En la MSR es importante tener presente las regiones de operabilidad y experimental, en primera instancia, el punto óptimo puede localizarse en cualquier lugar de la región de operabilidad, dentro o afuera de la región experimental. Es de esperarse que el punto óptimo se encuentre cercano o dentro de las condiciones de operación establecidas y por lo tanto dentro de la región experimental inicial (Gutiérrez Pulido, 2012; Montgomery, 2017). Es necesario generar una distribución razonable de puntos en toda la región de interés utilizando el menor número posible de puntos experimentales. De esta forma, se asegura que para cada punto x , el valor ajustado, $\hat{Y}(x)$, esté tan cerca como sea posible del valor real, $Y(x)$. Los cuatro diseños más utilizados son el diseño factorial completo, compuesto central, Box-Behnken y centroide simplex de mezcla (Ferreira et al., 2007; Myers et al., 2016). De estos cuatro, el diseño central compuesto (DCC) es el más utilizado.

5.1.3 Diseño central compuesto

El DCC no sólo optimiza el proceso de producción de biomasa, sino que también reduce los costos y el tiempo experimental ya que minimiza el número de experimentos que deben realizarse en el laboratorio (Kiran et al., 2016). Un DCC consiste en (Moheman et al., 2018):

1. Parte factorial: un diseño factorial 2^k , completo o fraccional, en el que los niveles están codificados en la forma habitual como ± 1 ,
2. Número de puntos o repeticiones al centro del diseño (n_0), con $n_0 \geq 1$,
3. Parte axial: dos puntos axiales en los ejes correspondientes a cada uno de los factores, situados a una distancia α del centro del diseño, llamados puntos estrella (Figura 10).

Por lo tanto, el número total de puntos del diseño es $N = 2^k + 2k + n_0$. (Fernandez et al, 2001).

Los diseños experimentales tendrán cinco niveles, cuyos valores se encuentran dentro y por fuera de los rangos estudiados en los diseños de *screening*.

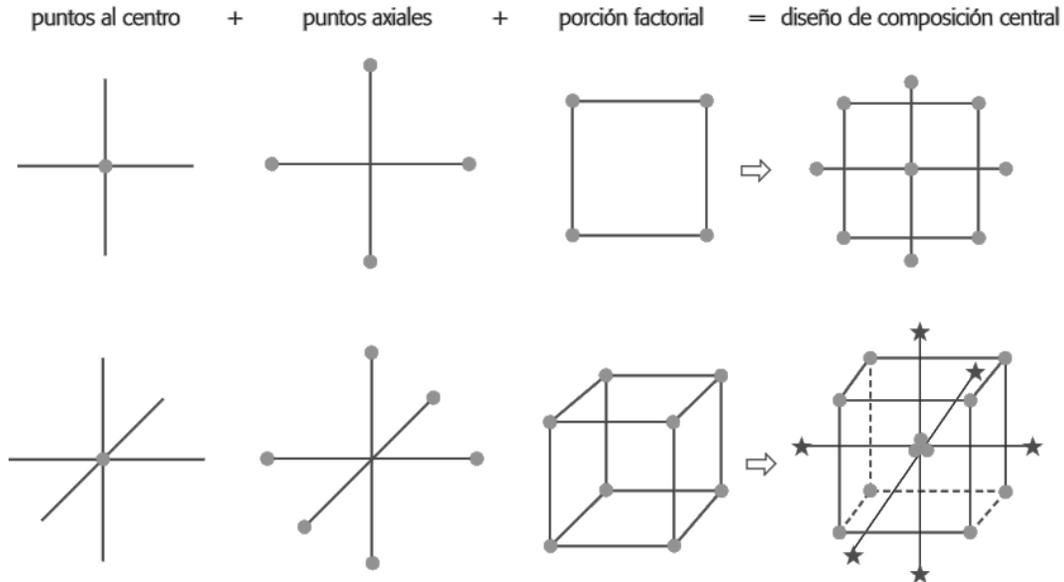


Figura 10. Representación y construcción de los DCC.

Los datos obtenidos se ajustan a una ecuación polinómica de segundo orden mediante un procedimiento de regresión múltiple, en donde se obtiene un modelo empírico que relaciona las variables respuestas con las variables independientes (factores) del experimento (Vohra & Satyanarayana, 2002). La producción de biomasa se puede predecir a través del modelo y debe ser capaz de describir adecuadamente el comportamiento de los datos para poder realizar predicciones estadísticas. El modelo es apropiado cuando la regresión es significativa ($p < 0,05$) y se obtiene una falta de ajuste insignificante ($p > 0,05$) para el nivel de confianza seleccionado. También, es necesario analizar el coeficiente de determinación (R^2), la distribución normal de los residuos, validez del ANOVA y la homogeneidad de la varianza (Moheman et al., 2018; Myers et al., 2016).

5.1.4 Validación

Para determinar la validación del modelo, se debe llevar a cabo una nueva serie de experimentos en el medio de cultivo optimizado a través de los diseños estadísticos

experimentales. Para obtener una medida cuantitativa del rendimiento del modelo, se calculan dos índices de validación: factor de precisión (A_f) y factor de sesgo (B_f). El factor de precisión (A_f) es una medida de la dispersión de los resultados experimentales con respecto a los valores predichos. El factor de sesgo (B_f) es una medida de la desviación media relativa de los valores predichos y observados. El valor de A_f resulta ser siempre mayor o igual a 1, mientras que el factor de sesgo puede variar entre $0 \leq B_f \leq 1$. Un factor de sesgo de 1 y un factor de precisión de 1 representan una concordancia perfecta entre los valores observados durante el desarrollo experimental y los predichos por el modelo. Por otro lado, un valor de $B_f < 1$ indica que el modelo suele predecir menor producción de biomasa que la observada y por el contrario un valor de $B_f > 1$ indica que el modelo predice mayor producción de biomasa que la observada. Así mismo, un valor de $A_f > 1$ indica una baja precisión de la estimación media entre la producción de biomasa observada y predicha (Bravo et al., 2019; Gorordo et al., 2023; Mellefont et al., 2003).

6 Formulación

Independientemente de la estrategia utilizada para la producción y concentración del ACB, es necesario desarrollar una metodología con respecto a su formulación, ya sea líquida o sólida, que optimice el rendimiento, la eficacia y la vida útil del producto desarrollado (Abadias et al., 2001). Sin embargo, no todos los ACB pueden sobrevivir a las condiciones impuestas durante el proceso de formulación. Se puede lograr una mejora de la viabilidad utilizando condiciones especiales durante el cultivo o añadiendo sustancias protectoras a la biomasa obtenida (Teixidó et al., 2022).

La liofilización es una de las tecnologías más utilizadas para la conservación de microorganismos, ya que estudios han demostrado que mantiene la viabilidad de los microorganismos por años y no requiere condiciones especiales para su conservación (Day & Stacey, 2007). Sin embargo, implica graves daños para los microorganismos durante el proceso, como la desnaturalización de proteínas y la reducción de la viabilidad (de Arruda Moura Pietrowski et al., 2015). Asimismo, la liofilización es el método más caro si se compara con otros procesos de secado (secado *spray* y lecho fluido) debido principalmente al costo del equipamiento, al elevado consumo de energía y a la duración del proceso (Strasser et al., 2009). Existe muy poca bibliografía sobre todos estos aspectos, ya que los

procesos de producción y formulación suelen correr a cargo de empresas privadas (o en asociación con ellas), por lo que estas investigaciones se llevan a cabo bajo acuerdos de confidencialidad (Teixido 2022, Droby 2016).

Otra metodología ampliamente utilizada es el secado *spray*, es un método económico y rápido en el que se obtienen grandes cantidades de producto, sin embargo, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso (Teixidó et al., 2022).

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 células frescas o formuladas 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 & Spotts, 1997; Droby et al., 1998; El-Ghaouth, Smilanick, Brown, et al., 2000; Gorordo et al., 2022; Govender et al., 2005; W. J. Janisiewicz & Jeffers, 1997). 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.

8 Levaduras como agentes de control biológico

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 & Prasad, 2009; Starmer & Lachance, 2011; Buzzini et al., 2012). 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 & Droby, 2016). Son capaces de adaptarse y crecer de forma rápida en medios de cultivos basados en sustratos económico a pequeña y gran escala, lo que facilita y economiza su producción (Spadaro et al., 2010). No producen esporas o micotoxinas alergénicas a diferencia de los hongos filamentosos, y tienen requisitos nutricionales simples que les permiten colonizar superficies secas durante largos períodos de tiempo

(Spadaro & Droby, 2016). 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 & Margesin, 2014; Ferreira et al., 2023; Hu et al., 2015; Luo et al., 2019; Margesin, 2009). Debido a estas características, una gran cantidad de los ACB reportados en bibliografía son levaduras. En un periodo de 60 años, de 1963 a 2023, se han realizado numerosos estudios sobre la aplicación de mecanismos de biocontrol en el sector agroalimentario (Tabla 4).

Tabla 4. Especies de levaduras aisladas a partir de frutas con capacidad biocontroladora sobre patógenos de postcosecha.

Fruta	Especie de levadura	Patógeno	Referencia
Manzana, pera Uva	<i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i> <i>B. cinerea</i>	Doores & Splittstoesser, (1983) Kurtzman & Droby, (2001)
Tomate	<i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida oleophila</i>	<i>B. cinerea</i>	Saligkarias et al., (2002)
Cerezas	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>Monilinia laxa</i>	Schena et al., (2003)
Ciruelas, duraznos	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Monilinia laxa</i>	Zhang et al., (2010)
Higo	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Monilinia laxa</i> , <i>P. expansum</i>	Ruiz-Moyano et al., (2016)
Naranja	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida stellimalicola</i>	<i>P. italicum</i>	da Cunha et al., (2018)
Pera	<i>Vishniacozyma victoriae</i> <i>Pichia membranifaciens</i>	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	Lutz et al., (2020)
Manzana, limón	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>P. digitatum</i> , <i>P. expansum</i>	Agirman & Erten, (2020)
Kiwi	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	<i>B. cinerea</i>	Nian et al., (2023)

8.1 Biología de las levaduras

El uso de levaduras se ha convertido en una práctica habitual en diversos campos, como la industria de las fermentaciones, la industria alimentaria, la ciencia médica, la

investigación y la agricultura (Mukherjee et al., 2020). Las levaduras pertenecen al grupo de los hongos; en su mayoría organismos unicelulares, que se reproducen por gemación o por fisión. Las levaduras pueden clasificarse en Ascomycetes (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida*) y Basidiomycetes (por ejemplo, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Rhodotorula*, *Vishniacozyma*). En Kurtzman et al. (2011) se describen aproximadamente 1500 especies de levaduras.

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en microbiomas en todo el mundo, crecen en todo tipo de sustratos y ambientes, son capaces de colonizar ambientes terrestres, aéreos y acuáticos. Generalmente viven sobre la superficie de plantas y animales, aunque también se las encuentra en el agua e incluso en ambientes extremos como glaciares, océanos, lagunas ácidas, etc. (Sangorrín et al., 2014).

Todas las especies de levaduras conocidas hasta el momento asimilan glucosa y fructosa. Utilizan estos sustratos aeróbicamente como fuente de carbono y energía; mientras que sólo algunas pueden fermentarlos en condiciones de anaerobiosis. Otras levaduras también son capaces de asimilar y degradar moléculas orgánicas que incluyen: lípidos, compuestos aromáticos, ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos complejos (Kurtzman et al., 2011).

Dada su gran versatilidad, adaptabilidad y disponibilidad, las levaduras constituyen uno de los grupos microbianos más relevantes en biotecnología (Buzzini & Margesin, 2014).

8.2 Levaduras como ACB en Argentina

En Argentina el control de enfermedades fúngicas en la postcosecha se ha basado en fungicidas sintéticos. Sin embargo, hay pocos principios activos eficientes y registrados en el país. El control biológico se presenta como una alternativa prometedora para la producción orgánica e integrada (Robiglio et al., 2011). 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 los últimos años, ha habido un aumento de estudios en Argentina 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) y 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 & Carrillo, 2004; Díaz et al., 2020; Visintin et al., 2007).

En el grupo de investigación donde fue desarrollada la presente Tesis doctoral se seleccionó a *Cystofilobasidium capitatum* por su capacidad controladora sobre *P. crustosum* y *M. piriformis* en frutas finas de la Patagonia (López et al., 2016 y Villalba et al., 2016). Así mismo se han seleccionado y patentado el uso de levaduras nativas (*Pichia membranifaciens* y *Vishniacozyma victoriae*) con capacidad biocontroladora sobre *P. expansum* y *B. cinerea* en peras (Robiglio et al., 2011, Lutz et al., 2012 y 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 y 2023).

8.3 *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 *Vishniacozyma 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 (Gramisi 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 y no se detectó actividad fosfolipasa (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. Determinaron que la manipulación del entorno químico mediante la adición de CaCl_2 2% da como resultado una actividad antagónica 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 (Sepulveda et al., 2022).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis de trabajo

El escalado de la producción de la levadura *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263 con medios económicos logra producir grandes cantidades de biomasa fresca y seca que conserva la capacidad antagónica para ser usada en el control biológico de enfermedades postcosecha en peras.

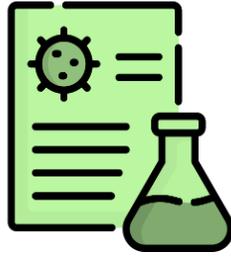
Objetivo general

Optimizar un medio de cultivo y escalar el desarrollo de biomasa de *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263, levadura seleccionada para el control biológico en postcosecha de peras.

Objetivos específicos

- ◆ Aplicar Diseños Estadísticos Experimentales para optimizar la producción de biomasa de *V. victoriae* NPCC 1263 en medio económico utilizando dos residuos agroindustriales a nivel de 100 mL.
- ◆ Caracterizar los parámetros de producción de biomasa de *V. victoriae* NPCC 1263 en el medio optimizado en reactor *batch* y semicontinuo de 15 L.
- ◆ Escalar la producción de biomasa en el medio optimizado en *batch* de 100 L en planta piloto.
- ◆ Evaluar la viabilidad de las levaduras luego del secado por liofilizador y secado spray.
- ◆ Aplicar en línea comercial de empaque de peras la biomasa obtenida en las diferentes escalas de producción empleando la preparación fresca y seca-rehidratada de las levaduras.
- ◆ Evaluar la capacidad antagonista de las levaduras en aplicaciones en línea de empaque y su capacidad de crecer sobre la superficie de las frutas durante el período de conservación en cámaras frigoríficas.

MATERIALES Y MÉTODOS



1 Preparación del material biológico y vegetal

1.1 Microorganismo y preparación de inóculo

Esta levadura *V. victoriae* NPCC 1263 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.” Lugar de presentación: Instituto Nacional de la Propiedad Industrial. N° de presentación: 20120101053. Inventores: Sangorrín/Sosa/Lopes/Lutz. Titulares: CONICET/Universidad Nacional del Comahue.

La levadura *V. victoriae* NPCC 1263 se conserva en glicerol 20% v/v a -20°C en la Colección de Cultivos de la Patagonia Norte, North Patagonian Culture Collection (NPCC), Neuquén, Argentina. Para obtener un cultivo fresco de la levadura se siembra una alícuota de 10 µL del vial del cepario en placas de glucosa, peptona y extracto de levadura agar (GPY Agar: Extracto de levadura 5 g/L; Peptona 5 g/L; Glucosa 40 g/L; Agar 20 g/L) durante 48 h a 20°C. Para cuantificar el número de células de levaduras para iniciar los cultivos, se realiza una suspensión en agua destilada estéril (ADE) y se cuantifica el número de células por mL en cámara de Neubauer.

1.2 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 distintos varietales de las frutas ensayadas fueron cosechados con madurez fisiológica siguiendo las prácticas tradicionales del manejo postcosecha y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95% de HR) hasta realizar el ensayo.

1.3 Frutas de producción convencional

Se emplearon peras del cultivar Packham's Triumph y manzanas del cultivar Red Delicious. Las frutas de producción convencional con CAPTAN® 0,2% v/v y CERCOBIN® 0,15% v/v, fueron provistas por Cooperativa Los Pioneros Ltda. Esta se encuentra ubicada en la ciudad de General Roca, provincia de Río Negro, quien también cedió sus instalaciones para el ensayo en línea y conservación en cámara fría en la temporada 2022 (Convenio Exp. N° CONICET 8915-2014). Los distintos varietales de las frutas ensayadas fueron cosechados con madurez fisiológica siguiendo las prácticas tradicionales del manejo postcosecha y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95% de HR) hasta realizar el ensayo.

2 Optimización de medios de cultivos

2.1 Evaluación del crecimiento de las levaduras en diferentes medios de cultivo

Se utilizaron para diseñar los medios de cultivo para *V. victoriae* dos fuentes de carbono diferentes provenientes de residuos agroindustriales para la optimización de medios. En primer lugar, se utilizó suero de queso en polvo (SQP), marca Vacalin®, que sirvió como fuente de carbono, energía y otros elementos nutricionales para el crecimiento de la levadura. La composición química de este residuo es de lactosa (75 % p/p) y proteínas (15 % p/p). Se preparó una solución concentrada de suero de queso (20 %) en agua destilada, se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121°C, para permitir la precipitación de la caseína, y después se filtró en condiciones asépticas. La solución concentrada finalmente es diluida hasta alcanzar las concentraciones requeridas en las diferentes condiciones de medios de cultivo evaluados.

En segundo lugar, se utilizó mosto de manzana (MM) obtenido de la producción de sidra de un establecimiento de la ciudad de Allen, Río Negro (Saenz Briones y Cia S.A) en las temporadas 2021, 2022 y 2023. 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 evaluadas para el crecimiento de la levadura.

Se realizaron ensayos preliminares en Erlenmeyer de 100 mL para evaluar el crecimiento de *V. victoriae* con concentraciones crecientes de SQP o MM a 20°C con velocidad de agitación de 150 rpm. Los cultivos que contenían SQP se combinaron con

sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), sulfato de magnesio (MgSO₄) y dextrosa. Por otro lado, los cultivos que contenían MM se combinaron con fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), sulfato de magnesio (MnSO₄), sulfato ferroso (FeSO₄), sulfato de cinc (ZnSO₄), urea y biotina. Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y esterilizados en autoclave por vapor saturado a 1 atm de sobrepresión (121°C, 2 atm, 20 min).

2.2 Modelado del crecimiento

Los resultados de cada experiencia fueron ajustados con el modelo de Gompertz propuesto por Zwietering et al. (1990)

$$y = A * \exp \left\{ - \exp \left[\left(\frac{(\mu_{\text{máx}} * e)}{A} \right) (l - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde $\mu_{\text{máx}}$ 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 $\mu_{\text{máx}}$, 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 un 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.

2.3 Diseño estadístico experimental (DEE)

El diseño experimental para la optimización de los dos medios de cultivo se realizó mediante el uso del software STATISTICA 8.0, eligiendo un Diseño Central Compuesto (DCC) con puntos estrella y la adición de puntos centrales. Se seleccionaron diferentes factores para la evaluación, teniendo en cuenta los requerimientos de la levadura reportados en bibliografía (Kurtzman et. al, 2011) y en datos previos del laboratorio (Gramisci 2019). Se codificaron los valores de los factores que resultaron ser significativos para el crecimiento de las levaduras. Se utilizó la metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para analizar los valores obtenidos de la variable respuesta estudiada en cada una de las

condiciones del diseño experimental. Para conocer las concentraciones óptimas de cada uno de los factores que componen el medio de cultivo y que maximizan el valor de la variable respuesta, se empleó la ecuación de segundo grado obtenida a partir del análisis del DCC y el método de las derivadas parciales, estos resultados se contrastan con aquellos observados en los gráficos de superficie de respuesta.

Para optimizar un medio de cultivo basado en SQP se evaluaron cinco factores: SQP (X_1), dextrosa (X_2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_3), MgSO_4 (X_4) y KH_2PO_4 (X_5). Cada factor se estudió en cinco niveles diferentes ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$). Se realizaron 27 ensayos y los puntos estrella ($\pm\alpha$) se situaron a ± 2 del centro para tener en cuenta la rotabilidad, lo que permite realizar predicciones con la misma precisión en todas las direcciones de la superficie ajustada (Montgomery, 2017).

2.4 Validación de medios de cultivos optimizados

Para la validación de los modelos se llevaron a cabo una nueva serie de experimentos haciendo crecer la levadura en los medios optimizados. Se realizaron cultivos a escala laboratorio de 100 mL y 1000 mL conteniendo las concentraciones optimizadas de cada medio de cultivo y un inóculo fresco de inicio de 1×10^5 cel/mL. Se determinaron los valores de peso seco (g/L), la absorbancia a 640 nm y el valor A ($\ln(\text{DO}_t/\text{DO}_i)$). Los crecimientos a nivel de reactor (12 L), también sirvieron para validar los medios de cultivo. Para obtener una medida cuantitativa del rendimiento de los modelos, se calcularon los factores de validación: factor de precisión (A_f) y factor de sesgo (B_f), según Mellefont et al.,(2003).

3 Métodos analíticos

3.1 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 a 640 nm. La biomasa de los cultivos se determinó por peso seco a partir de 10 mL del cultivo, esta alícuota se lavó por centrifugación a $4068 \times g$ con ADE y se secó en estufa a 105°C hasta peso constante. Para cuantificar el número de levaduras viables, 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 a 20°C.

3.2 Cuantificación de azúcares

La cuantificación de azúcares reductores se realizó por el método colorimétrico DNS (Miller, 1959). Se añadieron 100 µL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 100 µL de muestra, se incubó a 100°C durante 5 min y se detuvo la reacción con hielo. Se añadió 1 mL 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 reactores *batch* y semicontinuo 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.

3.3 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 añadieron

2 mL de reactivo a 10 µL 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.

3.4 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 µL de muestra, luego de 10 minutos, se agregan 100 µL 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 Producción de biomasa

4.1 Reactor a escala laboratorio

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 11). 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 a 20°C, 300 rpm y 0,64 vvm de aireación.

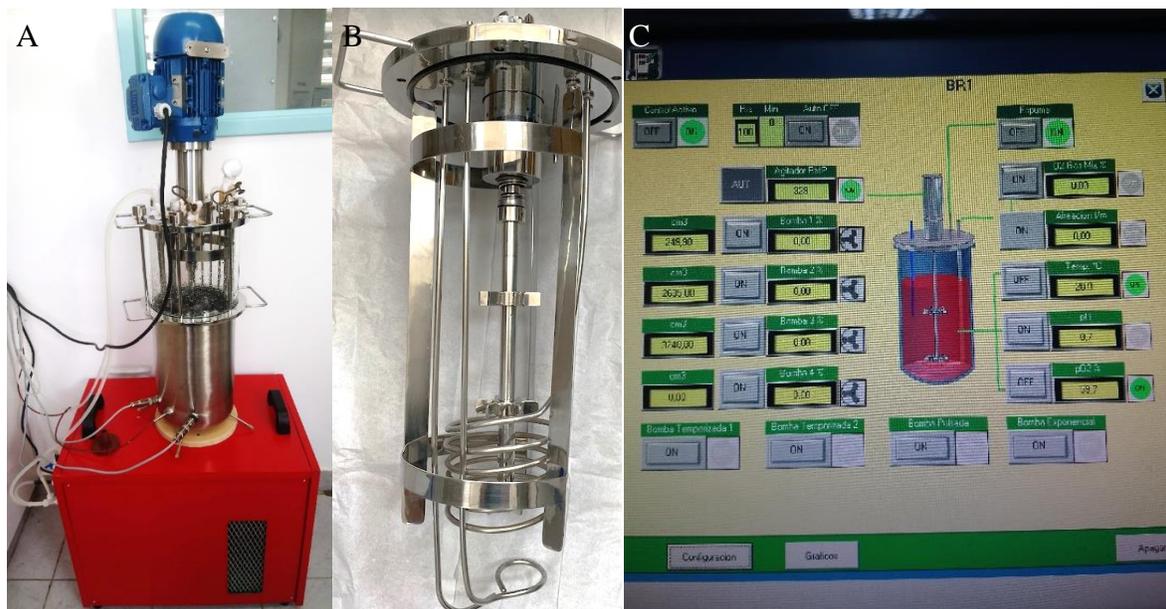


Figura 11. (A) Reactor escala laboratorio con motor y equipo de refrigeración. (B) Parte interna del reactor, agitadores, serpentín y aireador. (C) Software de control.

4.1.1 Reactor *batch*

Se realizaron cultivos en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL para cada uno de los medios de cultivo optimizados (basado en SQP o MM). 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 el reactor con 11 L del mismo medio de cultivo. Durante el cultivo en el reactor se cuantificó la DO a 640 nm y se tomaron muestras a diferentes tiempos para cuantificar peso seco, concentración de azúcar y amonio. El cultivo se creció hasta antes de alcanzar la fase estacionaria, momento que se determinó por el gráfico logarítmico del crecimiento. Una vez finalizado el cultivo se cosechó la biomasa por centrifugación en una centrifuga SORVALL RC 5C plus o por filtración tangencial, con un filtro de fibra hueca (PVDF) de 100.000 Dal y 0,5 m² de superficie. La biomasa obtenida se conservó en ADE o mediante liofilización, para ser empleada en aplicación en línea de empaque (Figura 13-A).

4.1.2 Reactor semicontinuo

4.1.2.1 Producción de biomasa utilizando suero de queso proteico

Con el objetivo de evaluar otra calidad de SQP, se llevó a cabo la producción de biomasa en un reactor semicontinuo (RSC) en un medio de cultivo no optimizado basado en suero de queso en polvo protéico (SQPP) con el agregado de sales. El SQPP contenía un 35% p/p de proteínas y 48% p/p de lactosa. Debido a la baja cantidad de lactosa, esta fue adicionada estéril al resto del medio para alcanzar 60% p/v. El ensayo se llevó a cabo en el instituto PROIMI en la ciudad de San Miguel de Tucumán.

Para evaluar el crecimiento de la levadura se utilizó un reactor tanque agitado de 10 L LH210 con un volumen de trabajo de 7 L. El medio de cultivo estaba compuesto por: SQPP, 20 g/L; (NH₄)₂SO₄ 2 g/L; KH₂PO₄, 5 g/L y lactosa, 30 g/L. Durante todo el proceso del cultivo semicontinuo el pH se mantuvo entre 4,5 y 5,7 y la temperatura entre 20,5 y 21,7°C. La agitación aumentó de 250 a 350 rpm y la aireación de 1,5 vvm a 2,5 vvm. El cultivo inició como un reactor *batch* y luego de 48 horas, cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, se retiraron 3,5 L de medio de cultivo con biomasa mediante una bomba peristáltica y se agregaron 3,5 L de medio de cultivo estéril. El procedimiento se repitió una

vez a las 24 horas. Se alcanzó un volumen final de producción de 14 L. Se determinaron las UFC/mL para cada muestra.

4.1.2.2 Producción de biomasa en medio optimizado

Los cultivos iniciadores del reactor se realizaron del mismo modo que para un reactor *batch*. Una vez inoculado el reactor con 1 L de cultivo iniciador, el cual contenía previamente 11 L de medio de cultivo estéril, se procedió a medir la DO a 640 nm, se mantuvo a 20°C y 300 rpm utilizando el medio optimizado. 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 (Figura 13-C). Antes de cada alimentación, se retiraron 5 L del contenido del reactor y, a continuación, se añadieron 5 L del medio de cultivo fresco estéril con una bomba peristáltica hasta alcanzar una producción de 27 L de volumen. 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 se determina para el proceso global de producción.

4.2 Producción de biomasa en reactor a escala piloto

La producción de biomasa a escala piloto (100 L) se realizó en el instituto PROIMI en la ciudad de San Miguel de Tucumán, Pcia. de Tucumán (Figura 12).

Se realizó un inóculo inicial de 500 mL en Erlenmeyer de 2 L con el medio de cultivo optimizado basado en SQP, con un inóculo fresco de inicio de 1×10^5 cel/mL. Se creció hasta la mitad de la fase exponencial y en ese momento se inoculó en un reactor de 10 L con 8 L de medio de cultivo. Cuando el cultivo llegó a mitad de la fase exponencial, los 8,5 L de cultivo se inocularon en el reactor de 140 L con 92 L del mismo medio de cultivo, previamente esterilizado *in situ*. Durante el cultivo se procedió a medir la DO a 640 nm y tomar muestras para cuantificar UFC/mL, concentración de azúcar y amonio. El cultivo creció hasta alcanzar la fase estacionaria, momento que se determinó por el gráfico logarítmico del crecimiento. Una vez finalizado el cultivo se cosechó la biomasa por filtración tangencial. La biomasa obtenida se congeló a -20°C durante 48 h, con el agregado de glutamato monosódico (GMS) (1% p/v) como crioprotector y suero de queso en polvo

(30% p/v) como agente protector. Finalmente se liofilizó y se secó por spray. La biomasa seca se conservó a 20°C hasta su aplicación (Figura 13-B).

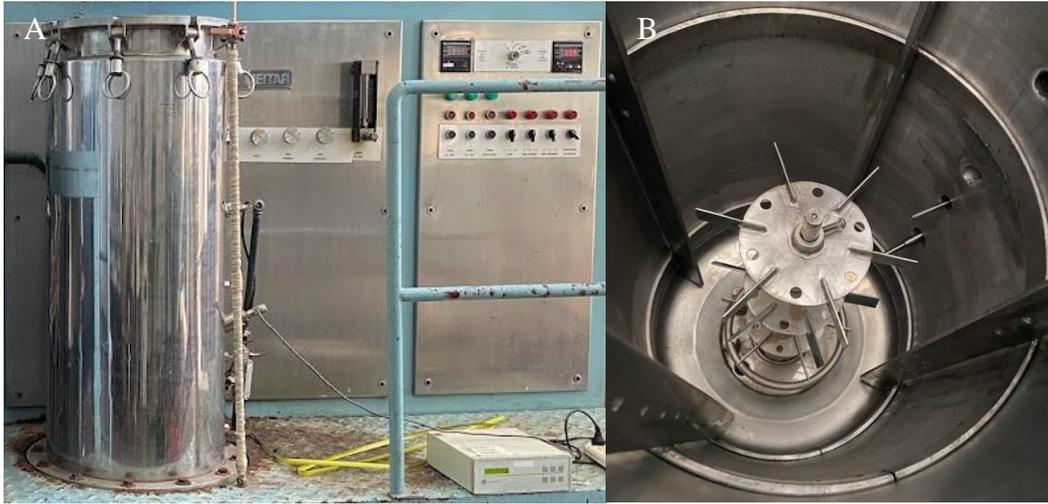


Figura 12. (A) Reactor piloto 140 L. (B) Parte interna del reactor.

4.3 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La)

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) se determinó mediante el método dinámico propuesto por Bandyopadhyay et al., (1967), para los dos medios de cultivo optimizados tanto a escala laboratorio como escala piloto. En este método, se utiliza la actividad respiratoria de un cultivo en crecimiento para disminuir el contenido de oxígeno en la mezcla antes de reiniciar la aireación. El reactor con el cultivo en desarrollo se agita y se airea a velocidades fijas de modo que la concentración de oxígeno disuelto (C_{AL}) sea constante. En ese momento, se corta el suministro de aire y la agitación, permitiendo que el cultivo consuma el oxígeno disponible en el medio de cultivo.

A continuación, se reinicia el suministro de aire a un caudal constante y se mide el aumento de C_{AL} con el electrodo de oxígeno disuelto al largo del tiempo. Es importante que la concentración de oxígeno se mantenga por encima del nivel crítico (C_{crit}), que es entre un 15%-20%, para que la tasa de absorción de oxígeno por las células se mantenga independiente de la tensión de oxígeno disuelto. El proceso de medición finaliza una vez que la concentración de oxígeno disuelto alcanza un valor constante (\bar{C}_{AL}); que refleja un equilibrio entre el suministro y el consumo de oxígeno en el sistema.

De esta forma, se obtiene una ecuación para k_La en términos de los datos obtenidos experimentales. La tasa de cambio en la concentración de oxígeno disuelto es igual a la tasa

de transferencia de oxígeno del gas al líquido, menos la tasa de consumo de oxígeno por las células:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) - r_O \quad (Ec. 5)$$

donde $-r_O = q_O x$ (r_O : tasa volumétrica de consumo de oxígeno; q_O : tasa específica de consumo de oxígeno; x : concentración de biomasa). De la representación gráfica de la caída de oxígeno se determina $-r_O$ como la pendiente de la recta, de la representación gráfica del proceso de re-oxigenación hasta alcanzar la concentración final de oxígeno disuelto en estado estacionario (\bar{C}_{AL}) se calcula $\frac{dC_{AL}}{dt}$. Del gráfico de $\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + r_O\right)$ vs t se obtiene el valor de $k_L a$ como la pendiente de curva ($-1/k_L a$) y el valor de la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo (C_{AL}^*) de la ordenada al origen.

5 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 casi cero y a medida que el filtro se vaya obstruyendo, ira aumentando. Se procuró no exceder 1 bar (0,1MPa) de presión de entrada para evitar la colmatación del filtro.

6 Evaluación de diferentes técnicas para la formulación del ACB

6.1 Formulación líquida

Se evaluó la conservación de la biomasa fresca de la levadura en frío agregando distintos crioprotectores. Las temperaturas evaluadas fueron 4°C y -20°C, a su vez la

biomasa se combinó con GMS 1% v/v, glicerol 10% v/v y sorbitol 15% v/v como crioprotectores. Se evaluó la viabilidad luego de 30 días de conservación.

6.2 Formulación seca

6.2.1 Liofilización

Se realizaron ensayos para definir la mejor formulación de la biomasa que permita conservar la mayor viabilidad luego de la liofilización. Se evaluaron dos temperaturas de congelación (-20°C y -80°C) con el agregado de tres crioprotectores y dos agentes protectores. Los crioprotectores utilizados fueron: GMS (1% v/v), sorbitol (1-15% v/v) y glicerol (1% v/v). Los agentes protectores, suero de queso en polvo (30% p/v) y leche en polvo descremada (30% p/v).

En todos los casos, luego de 48 h de congelación se sometió a las levaduras al proceso de liofilización en un equipo Christ Beta 2-8 LD plus. El liofilizador fue operado a 0,18 mbar durante 72 h y -37°C para el secado primario. En cambio, para el secado final, fue operado a 0,14 mbar durante 1,5 h y -39°C. Posteriormente se las rehidrató durante 1 hora con ADE y se cuantificaron UFC por recuento en placa de GPY agar (tiempo 0 de conservación). La biomasa liofilizada se conservó a 20°C y se evaluó la viabilidad (UFC) durante los meses de conservación. El porcentaje de viabilidad se calculó considerando el total a las levaduras vivas iniciales del tiempo cero de la liofilización.

6.2.2 Secado spray

Se evaluó el secado por spray para la biomasa utilizando GMS (1% p/v) como crioprotector y suero de queso en polvo (30% p/v) como agente protector. Se utilizó el equipo BUCHI mini Spray Dryer B-290, los parámetros de secado fueron, C1: temperaturas de entrada/salida de 100°C/55°C; C2: temperaturas de entrada/salida de 80°C/49°C con un caudal volumétrico (Q) de 100 mL/h para las dos condiciones. Posteriormente la biomasa seca, se rehidrató durante 1 hora con ADE y se cuantificaron UFC por recuento en placa de GPY agar (tiempo 0 de conservación) y luego de 240 días de conservación a 20°C.

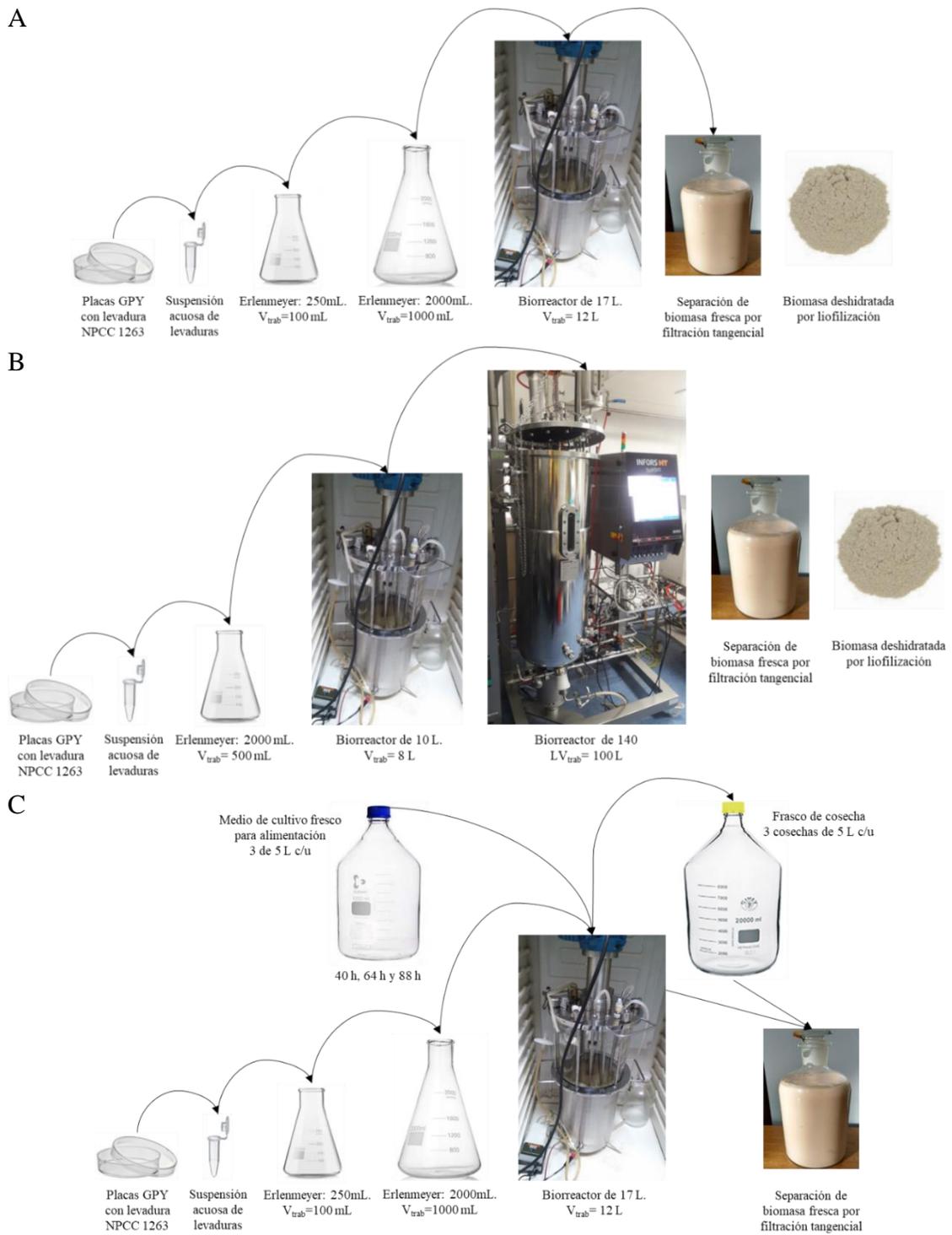


Figura 13. Esquema de producción de biomasa: (A) reactor *batch* escala laboratorio, (B) reactor *batch* escala piloto, (C) reactor semicontinuo.

7 Ensayos en línea de empaque

La evaluación a escala semicomercial de las levaduras se llevó a cabo en un empaque regional con manejo orgánico y otro con manejo convencional (La Deliciosa S.A, Cooperativa Los Pioneros Ltda), incluyendo la línea de procesamiento y cámaras de almacenamiento frigorífico. A lo largo de esta tesis, la biomasa producida se aplicó durante 5 temporadas consecutivas, entre 2019 y 2023 inclusive, ordenadas cronológicamente (Tabla 5). En cada ensayo, se evaluó la capacidad antagonista del ACB y se comparó la eficacia del mismo producido en los diferentes medios de cultivo propuestos, sistemas de producción y métodos de formulación empleados.

7.1 Aplicación de las levaduras antagonistas

La fruta ingresó a la línea de procesamiento en cajones bins con capacidad de 430-450 Kg (~1500 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. Posteriormente al tratamiento con levaduras, la fruta se secó en el 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 $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR (Figura 14).

Las levaduras se aplicaron con el agregado de 2% p/v de CaCl_2 , tanto fresca como rehidratada, todos los tratamientos se prepararon con 25 L de agua de red, usándose esta agua sin agregados como tratamiento control.

Tabla 5. Resumen de los ensayos en línea realizados entre los años 2019 y 2023.

Año	Configuración de reactor		Volumen				Medio de cultivo			Tratamiento*						Manejo empaque		Varietal
	RB	RSC	12	14	27	100	SQP	SQPP	MM	T1	T2	BFS	BF	BLRP	BLR	O	C	
2019	✓		✓				✓			✓	✓					✓		PBD
	✓		✓				✓			✓						✓		PPT
2020	✓		✓				✓					✓	✓			✓		PBD
	✓		✓				✓					✓	✓			✓		PPT
2021	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓		PPT
2022	✓	✓	✓		✓		✓		✓				✓		✓	✓	✓	PPT
	✓	✓	✓		✓		✓		✓				✓		✓	✓	✓	MRD
2023		✓			✓	✓	✓		✓				✓		✓	✓		PBD
		✓			✓	✓	✓		✓				✓		✓	✓		PPT
		✓			✓	✓	✓		✓				✓		✓	✓		MRD

RB: reactor batch; RSC: reactor semicontinuo. SQP: medio de cultivo basado en suero de queso en polvo; MM: medio de cultivo basado en MM; SQPP: medio de cultivo basado en SQP protéico. T1: biomasa fresca con 60 días de almacenamiento en frío; T2: biomasa fresca con 15 días de almacenamiento en frío, BFS: biomasa fresca sin el agregado de CaCl₂ 2% p/v; BF: biomasa fresca; BLR: biomasa liofilizada rehidratada; BLRP: biomasa liofilizada rehidratada crecida en SQPP. O: empaque de manejo orgánico; C: empaque de manejo convencional. PBD: pera Beurré D'Anjou; PPT: pera Packham's Triumph; MRD: manzana Red Delicious.

*Todos los tratamientos fueron realizados con el agregado de CaCl₂ 2 % p/v a excepción del tratamiento BFS.

7.2 Efecto del sistema de aplicación sobre las levaduras

Se tomaron muestras de las suspensiones de las levaduras a la salida de las boquillas del sistema de aplicación utilizado durante el ensayo, para establecer el efecto del sistema de aplicación (boquillas de aspersión o tubo perforado) 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 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 colocó cada fruto en una bolsa con 100 mL de ADE, se sometieron a agitación y fricción manual de superficie por 2 min. Se realizaron diluciones seriadas de las aguas de lavado 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 $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$ de fruto. Para estimar la superficie de peras se utilizó el método propuesto por Babic et al. (2012), mientras que para manzanas el método propuesto por Torabi et al. (2013).

7.4 Análisis estadísticos

La incidencia de la enfermedad causada por los tres 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:

$$\% I = \frac{b}{x} 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

donde % I: porcentaje de incidencia, x: número de frutos tratados, b: número de frutos tratados y enfermos.

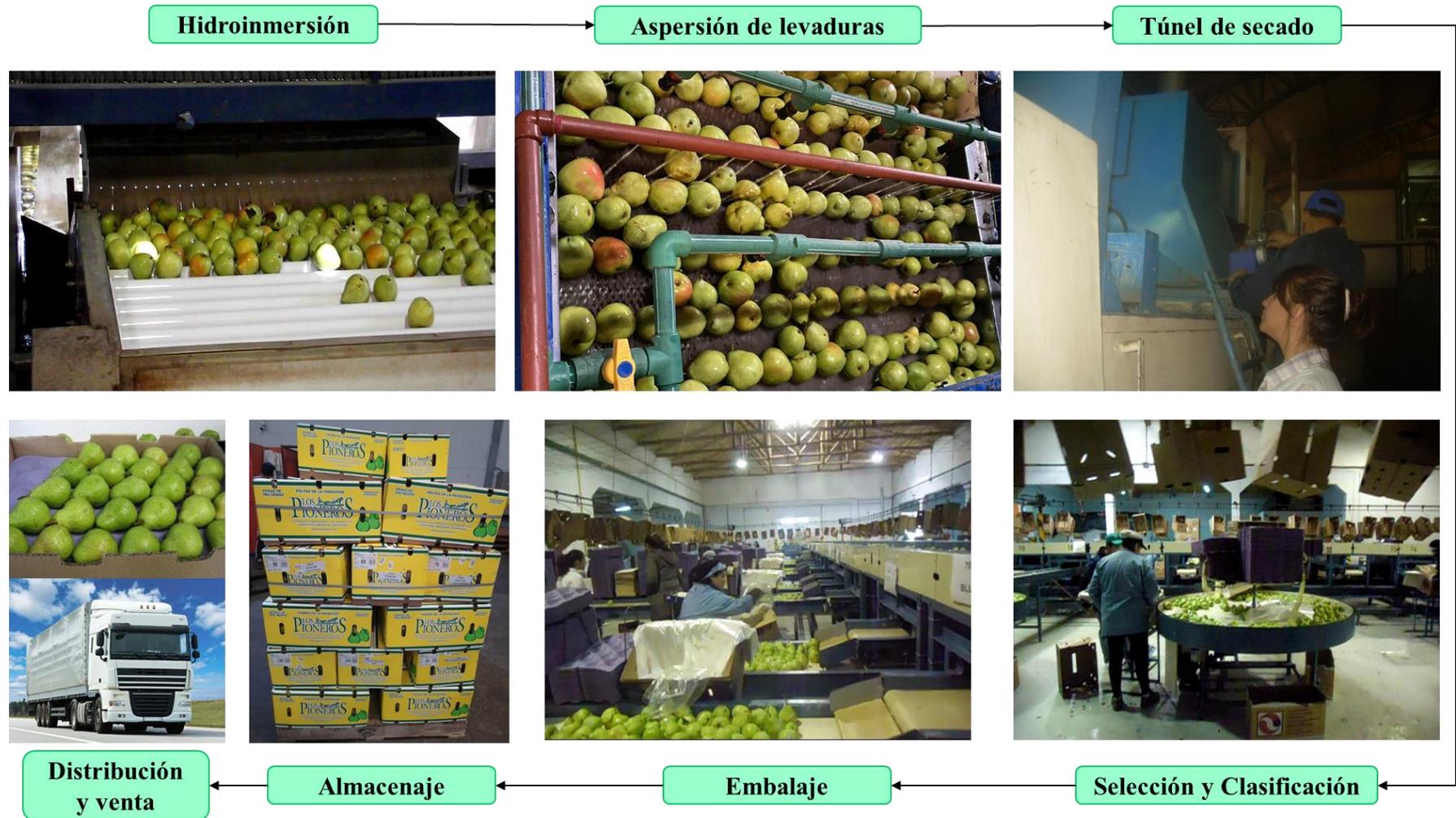
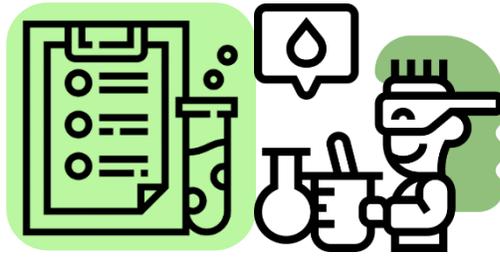


Figura 14. Etapas del procesamiento de la fruta tratada con las levaduras como agentes de control biológico.

RESULTADOS



Empleo de un medio de cultivo basado en suero de queso para el desarrollo del agente de control biológico *V. victoriae*

1 Caracterización del suero de queso en polvo (SQP)

El SQP es un polvo homogéneo, de color uniforme, blanco-amarillento (Figura 15), cuando este SQP es disuelto en agua y esterilizado, se precipitan gran cantidad de proteínas, por lo que es necesario filtrarlo para usarlo en los medios de cultivo.

Con el objetivo de conocer la composición del SQP que se empleó en los ensayos, se realizaron distintas determinaciones: azúcares, amonio, proteínas y nitrógeno fácilmente asimilable (FAN). Dentro de los minerales, los más importantes son el potasio (1100 ppm), el fósforo (710 ppm) y el calcio (500 ppm). Resultados muestran que el SQP posee una elevada concentración de azúcares reductores (incluida la lactosa) y una baja concentración de nitrógeno, por lo tanto, sería necesario adicionar al medio de cultivo una fuente de nitrógeno (Tabla 6). Por otro lado, de acuerdo a la ficha técnica del SQP, este contiene 4,5% p/p de humedad.

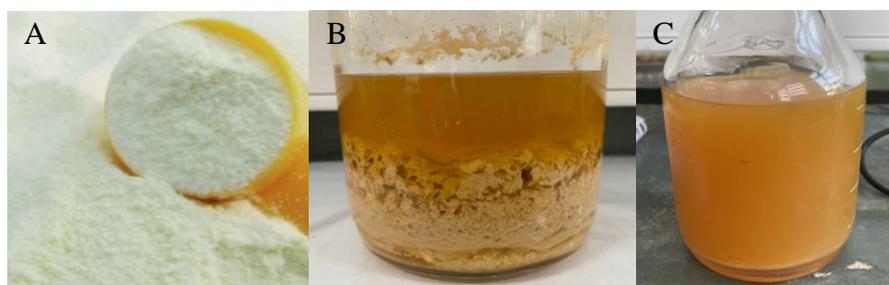


Figura 15. Suero de queso. (A) Suero de queso en polvo (SQP). (B) Suero de queso en polvo disuelto en agua y esterilizado. (C) Suero de queso en polvo diluido, estéril y filtrado.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de SQP preparado en solución 200g/L estéril.

Compuesto	Concentración
Azúcares reductores totales (g/L)	145,60 ± 25,53
Glucosa (g/L)	0,76 ± 0,18
Lactosa (g/L)	135,65 ± 25,70
FAN (ppm)	180,52 ± 5,76
NH ₄ ⁺ (ppm)	200 ± 20
Proteínas totales (g/L)	7,53 ± 1,43
Sodio (ppm)	280
Magnesio (ppm)	140
Fósforo(ppm)	710
Potasio(ppm)	1100
Calcio (ppm)	500
Hierro (ppm)	0,98
pH	6 ± 0,2

FAN: nitrógeno fácilmente asimilable

1.1 Evaluación de SQP como medio de cultivo

Se realizaron ensayos para evaluar el crecimiento de *V. victoriae* con diferentes concentraciones de fuentes de carbono y nitrógeno (factores), así como también micronutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras reportados en bibliografía y en trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio con *V. victoriae*. Se determinaron los parámetros de crecimiento obtenidos en los distintos cultivos para seleccionar la mejor combinación para la formulación de un medio de cultivo (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación del crecimiento de *V. victoriae* y parámetros experimentales obtenidos

C.E	Factores					Parámetros cinéticos y de producción					
	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃ (g/L)	X ₄ (g/L)	X ₅ (g/L)	A	μ _{máx} (h ⁻¹)	Lag (h)	X (g/L)	Y _{X/S} (g _B /g _S)	P _v (g/L,h)
1	40	-	-	-	-	4,31	0,07	17	3,05	0,25	0,018
2	40	20	-	-	-	4,35	0,08	20	3,75	0,27	0,022
3	40	10	-	-	-	4,44	0,07	19	4,54	0,26	0,017
4	40	10	2	-	5	4,74	0,10	21	5,16	0,25	0,036
5	40	10	2	0,25	5	4,84	0,10	22	5,79	0,26	0,040
6	40	-	2	0,25	5	4,45	0,10	56	3,58	0,27	0,026
7	50	-	2	0,25	5	4,34	0,08	41	5,93	0,31	0,041
8	60	-	2	0,25	5	4,48	0,07	24	9,51	0,42	0,040

C.E: corrida experimental. SQP (X₁), dextrosa (X₂), (NH₄)₂SO₄ (X₃), MgSO₄ (X₄) y KH₂PO₄ (X₅). X: concentración final de biomasa (peso seco); Y_{X/S}: rendimiento de biomasa expresado como g de peso seco /g de sustrato consumido; P_v: productividad volumétrica, (g de peso seco/ horas x litro).

La condición 8 (SQP 60 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, MgSO₄ 0,25 g/L y KH₂PO₄ 5 g/L) fue la que presentó mejor producción de biomasa, rendimiento y productividad, por lo tanto, esta composición de medio de cultivo fue seleccionada para producir biomasa en biorreactor.

2 Producción de biomasa en reactor *batch* de 15 L

Se realizaron dos cultivos *batch*, denominados reactor *batch* 1 (RB1) y reactor *batch* 2 (RB2), con el objetivo de obtener la biomasa necesaria para evaluar la aplicación de *V. victoriae* en línea de empaque comercial (Figura 16). Se determinaron los parámetros cinéticos, de producción de biomasa y las curvas de crecimiento (Tabla 8). Como puede observarse en reactor el rendimiento (Y_{X/S}) es más alto, con una menor fase *lag*, la misma velocidad de crecimiento y productividad volumétrica (P_v) que a nivel de frasco

Erlenmeyer (Tabla 7). Por otro lado, el valor de A y el peso seco fueron menores en reactor, cuando se compara a nivel de frasco en la condición 8 (Tabla 7).

La biomasa se dejó decantar en heladera durante cinco días y luego se concentró por centrifugación, este proceso generó una pérdida de viabilidad del 51% para RB1 y del 31,6% para RB2. La biomasa se mantuvo conservada en frío durante 60 (RB1) y 15 días (RB2) hasta su aplicación.

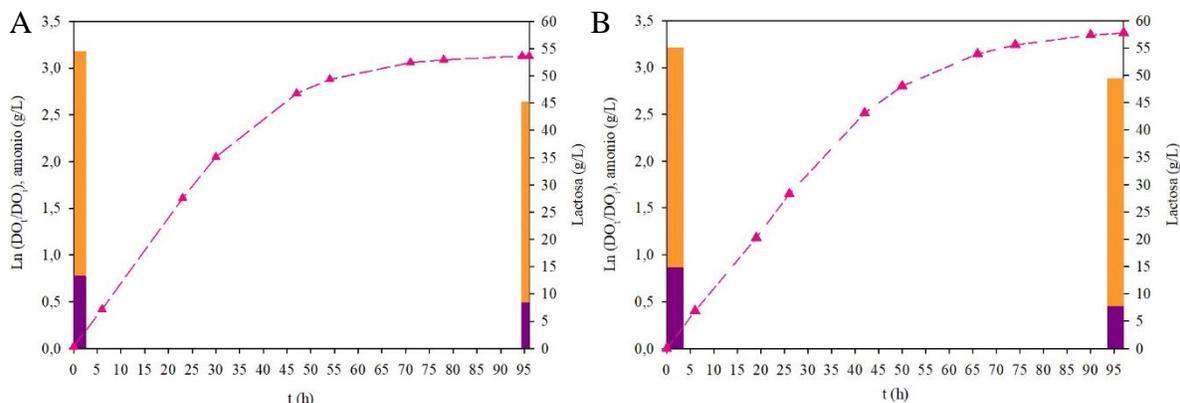


Figura 16. Curvas de crecimiento de dos reactores de *V. victoriae* a 20°C a escala de banco (15 L). Curvas de crecimiento modeladas por el modelo de Gompertz modificado. (A) Reactor 1. (B) Reactor 2. Amonio (■); lactosa (■); Ln (DO_t/DO_i) (—▲), DO_t: densidad óptica de la levadura al tiempo t, DO_i: densidad óptica inicial de la levadura.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en medio SQP.

Reactor	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/mL	X (g/L)	Y _{X/S} (g _X /g _S)	P _v (g/L.h)
RB1	3,16	0,07	1,28	96	5,78x10 ⁸	3,65	0,86	0,04
RB2	3,42	0,07	1,56	97	7,46x10 ⁸	4,62	0,92	0,05

Las curvas fueron modeladas por el modelo de Gompertz. $\mu_{m\acute{a}x}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DO_f/DO_i), DO_f: densidad óptica final, DO_i: densidad óptica; inicial X: concentración final de biomasa (peso seco); Y_{X/S}: rendimiento de biomasa expresado como g de peso seco /g de sustrato consumido; P_v: productividad volumétrica, (g de peso seco/ horas x litro). Medio SQP: condición 8 de la Tabla 7.

2.1 Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica de fruta

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagónica de *V. victoriae* crecida en SQP almacenada a diferentes tiempos, se realizaron ensayos en línea de empaque en peras en las

condiciones habituales de procesamiento y almacenamiento de la fruta. Los ensayos fueron realizados en dos variedades de peras. Packham's Triumph, con 1400-1500 frutas por bins con una presión promedio de 13,3 lb y contenido de sólidos solubles (SS) del 13%. Beurré D'Anjou con 2200-3000 frutas por bins con una presión promedio de 16 lb y contenido de sólidos solubles (SS) del 12%. Los tratamientos se llevaron a cabo cuando la fruta tenía un mes de almacenamiento en cámara frigorífica.

Se realizaron dos tratamientos con levaduras aplicando en cada uno 1×10^8 UFC/mL. **T1**: biomasa producida en **RB1** tras 60 días de almacenamiento en frío + CaCl₂ 2% p/v, **T2**: biomasa producida en **RB2** tras 15 días de almacenamiento en frío + CaCl₂ 2% p/v. Para calcular el porcentaje de control, los tratamientos nombrados se compararon con un tratamiento **Control** (agua + CaCl₂ 2% p/v).

Luego de 120 días de conservación en el varietal Beurré D'Anjou la incidencia natural total de enfermedades fúngicas en el tratamiento control fue de 0,31%, causada únicamente por *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium* spp. El tratamiento **T1** logró controlar a *B. cinerea* en un 62,96%, pero no fue capaz de controlar a *Alternaria-Cladosporium* spp (Figura 17, A). El tratamiento **T2** controló el 90,32% del total de las enfermedades fúngicas, el control de *B. cinerea* fue de 100% y para *Alternaria-Cladosporium* spp. el control fue 25%, (Figura 17, A).

Después de 180 días de almacenamiento en cámara fría, la incidencia natural total de las enfermedades fúngicas alcanzó el 1,56% en las peras del tratamiento control (Figura 17, B), distribuidas entre los diferentes patógenos en: 0,98% (*B. cinerea*), 0,27% (*P. expansum*) y 0,31% (*Alternaria-Cladosporium* spp.). El tratamiento **T1** redujo las enfermedades fúngicas totales en un 71%, correspondiendo a los diferentes patógenos en: 78% *B. cinerea*, 68% *Cladosporium* sp. y 48% *P. expansum*. Por otro lado, el tratamiento **T2** la redujo en un 92% el total de enfermedades fúngicas, correspondiendo el 100% *B. cinérea*, 89% *P. expansum* y 67,8% *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 17, B).

La incidencia natural de las enfermedades fúngicas sobre el varietal Packham's Triumph alcanzó valores mayores que en el varietal Beurré D'Anjou. El tratamiento control alcanzó el 1,27% de podredumbres luego de 120 días de conservación en cámara fría, el tratamiento **T1** logró controlar el 83,5% del total de las enfermedades, correspondiendo el 65% a *P. expansum*, 79% *B. cinérea* y 100% *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 17, C). Después de 180 días de conservación el porcentaje de incidencia natural total en el

tratamiento control alcanzó el 2,13%, mientras que para el tratamiento **T1** fue de 1,14%, lo que evidencia un 46,5% de control del total de las podredumbres, correspondiendo al control de los diferentes patógenos en: 10% a *P. expansum*, 57% *B. cinérea* y 50,7% *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 17, D).

Resultados obtenidos en **T2** sobre el varietal Packham's Triumph no se muestran por tener una alta incidencia natural inicial de enfermedades fúngicas. Este hecho puede deberse a un elevado porcentaje de fruta en mal estado en el bins tratado o a una incorrecta clasificación manual durante el procesamiento.

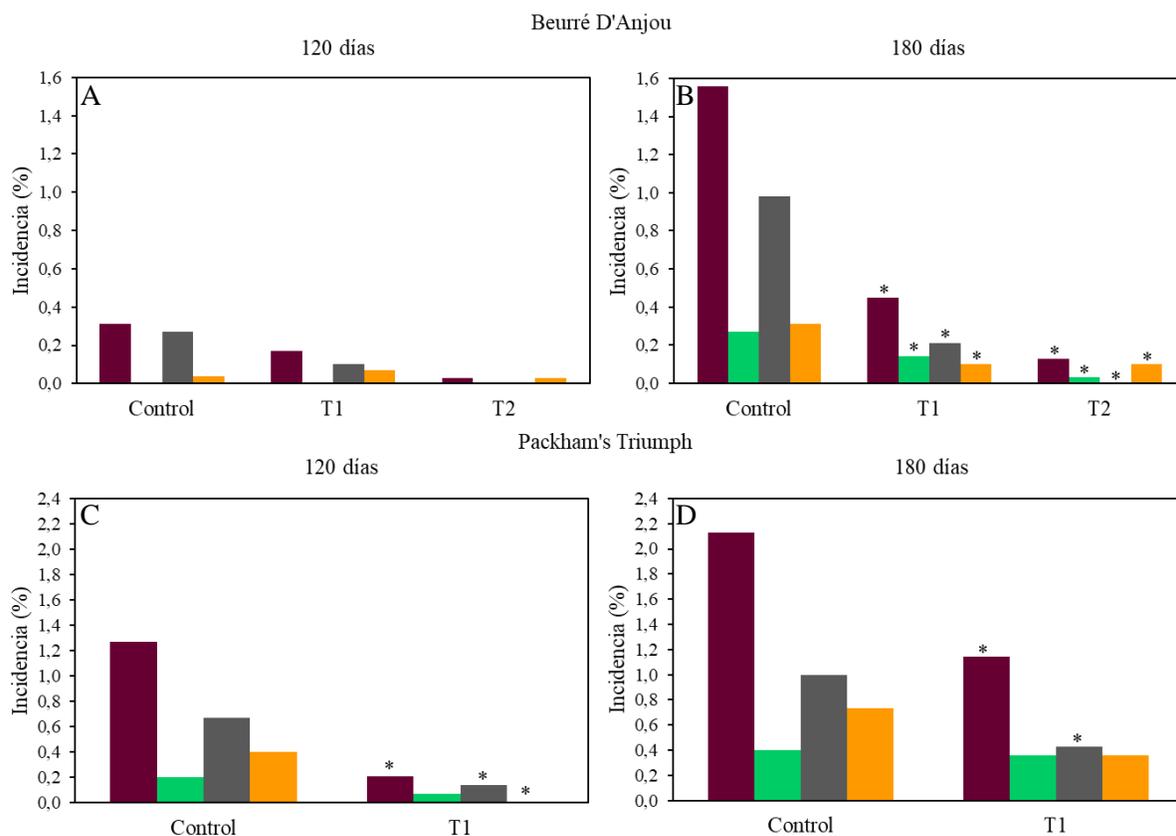


Figura 17. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total de podredumbres tras 120 (A y C) y 180 (B y D) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Beurré D'Anjou (A y B) y Packham's Triumph (C y D). Tratamientos: biomasa producida en **RB1** tras 60 días de almacenamiento en frío (**T1**); biomasa producida en **RB2** tras 15 días de almacenamiento en frío (**T2**). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinérea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

2.2 Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras

La levadura *V. victoriae* para actuar como ACB se aplica en la línea de empaque sobre la fruta por rociado, para esto deben pasar por un sistema de aplicación por pulverización (toberas). Con el objetivo de evaluar la viabilidad de las levaduras luego de este proceso, se tomaron muestras en el tanque donde se prepara la suspensión de levaduras y a la salida del sistema de aspersion (Tabla 9). Los resultados muestran una disminución significativa de la viabilidad de las levaduras al pasar por los picos pulverizadores, aproximadamente dos órdenes de magnitud.

Tabla 9. Efecto de las toberas de pulverización sobre la viabilidad de *V. victoriae*.

Tratamiento Varietal	T1		T2
	Packham's Triump	Beurre D'Anjou	Beurre D'Anjou
Tanque (UFC/mL)	4,50x10 ⁷ a	6,15x10 ⁷ a	7,50x10 ⁷ a
Pico (UFC/mL)	8,50x10 ⁵ b	4,50x10 ⁵ b	5,66x10 ⁵ b

Los valores dentro de una columna seguidos de diferente letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

3 Optimización de la producción de biomasa de *V. victoriae*

3.1 Diseño central compuesto

Con el objetivo de optimizar el medio de cultivo para el crecimiento de *V. victoriae*, se evaluaron diferentes factores mediante un diseño central compuesto (DCC). Se realizaron 27 ensayos y cada factor se estudió en cinco niveles diferentes (Tabla 10).

Tras el análisis de regresión de los datos, la ecuación polinómica de segundo orden resultante es:

$$Y = 8,25 + 2,53X_1 - 0,83X_3^2 + 0,65X_5 \quad (Ec. 4)$$

donde X_1 , X_3 y X_5 son los factores codificados de SQP, $(NH_4)_2SO_4$ y KH_2PO_4 respectivamente.

Los resultados de este estudio mostraron que el SQP y el fosfato diácido de potasio tienen un efecto lineal significativo positivo, es decir la máxima producción de biomasa se obtuvo en los cultivos con la máxima concentración de carbono y fosfato. Por otro lado, el sulfato de amonio tuvo un efecto cuadrático significativo negativo, lo que implica que es necesario un aporte nutricional menor para obtener la máxima producción de biomasa posible en estas condiciones. La dextrosa, el sulfato de magnesio y la interacción entre factores no resultaron significativas (Tabla 11).

Tabla 10. Diseño central compuesto (DCC) y resultados para la optimización de producción de biomasa (X_1 , SQP; X_2 , dextrosa; X_3 , $(NH_4)_2 SO_4$; X_4 , $MgSO_4$; y X_5 , KH_2PO_4).

Corrida	Valores codificados					Valores reales (g/L)					Biomasa (g/L)		t*(h)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Observada	Predicha	
1	-1	-1	-1	-1	1	20	4	0,4	0,05	7,5	5,25	5,04	189
2	-1	-1	-1	1	-1	20	4	0,4	0,25	2,5	3,67	3,78	170
3	-1	-1	1	-1	-1	20	4	2	0,05	2,5	3,05	2,88	170
4	-1	-1	1	1	1	20	4	2	0,25	7,5	3,71	4,29	161
5	-1	1	-1	-1	-1	20	20	0,4	0,05	2,5	4,36	3,72	189
6	-1	1	-1	1	1	20	20	0,4	0,25	7,5	3,44	3,56	189
7	-1	1	1	-1	1	20	20	2	0,05	7,5	5,18	5,01	137
8	-1	1	1	1	-1	20	20	2	0,25	2,5	4,41	4,56	170
9	1	-1	-1	-1	-1	60	4	0,4	0,05	2,5	7,23	7,16	161
10	1	-1	-1	1	1	60	4	0,4	0,25	7,5	6,33	7,01	137
11	1	-1	1	-1	1	60	4	2	0,05	7,5	10,39	10,79	189
12	1	-1	1	1	-1	60	4	2	0,25	2,5	7,39	8,11	161
13	1	1	-1	-1	1	60	20	0,4	0,05	7,5	11,56	11,50	221
14	1	1	-1	1	-1	60	20	0,4	0,25	2,5	6,83	7,09	137
15	1	1	1	-1	-1	60	20	2	0,05	2,5	10,64	10,61	189
16	1	1	1	1	1	60	20	2	0,25	7,5	10,32	11,05	170
17	-2	0	0	0	0	0	12	1,2	0,15	5	0,42	0,83	170
18	2	0	0	0	0	80	12	1,2	0,15	5	11,96	10,95	170
19	0	-2	0	0	0	40	0	1,2	0,15	5	7,84	7,12	170
20	0	2	0	0	0	40	28	1,2	0,15	5	9	9,12	161
21	0	0	-2	0	0	40	12	0	0,15	5	3,68	3,89	189
22	0	0	2	0	0	40	12	2,8	0,15	5	6,8	6,00	161
23	0	0	0	-2	0	40	12	1,2	0	5	7,99	8,76	137
24	0	0	0	2	0	40	12	1,2	0,35	5	8,32	6,95	189
25	0	0	0	0	-2	40	12	1,2	0,15	0	6,56	6,69	161
26	0	0	0	0	2	40	12	1,2	0,15	10	10,01	9,28	221
27 (C)	0	0	0	0	0	40	12	1,2	0,15	5	7,65	8,25	170

*Tiempo al comienzo de la fase estacionaria.

De este modo, el modelo predijo la producción de biomasa máxima de *V. victoriae* en 14,61 g/L, con los valores óptimos (codificados) de las tres variables significativas, $X_1=2$, $X_3=0$ y $X_5=2$. Por lo tanto, las condiciones óptimas de cultivo fueron: SQP, 80 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 1,2 g/L; KH_2PO_4 , 10 g/L.

Tabla 11. Coeficientes de regresión estimados a través del análisis ANOVA para la variable respuesta (producción de biomasa g/L), obtenidos en el DCC con cinco factores.

	Value	SD	p-value
β_0 -Mean/Intercept	8,2500	1,0473	0,0002
β_1 -lineal CWP	2,5292	0,2424	0,0000
β_{11} -quadratic CWP	-0,5900	0,2969	0,0941
β_2 -lineal Dextrose	0,5017	0,2424	0,0839
β_{22} -quadratic Dextrose	-0,0325	0,2969	0,9164
β_3 -lineal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5275	0,2424	0,0725
β_{33} -quadratic $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-0,8275	0,2969	0,0317
β_4 -lineal MgSO_4	-0,4542	0,2424	0,1101
β_{44} -quadratic MgSO_4	-0,0988	0,2969	0,7507
β_5 -lineal KH_2PO_4	0,6458	0,2424	0,0373
β_{55} -quadratic KH_2PO_4	-0,0663	0,2969	0,8308

El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,96, lo que indica que el modelo podía explicar el 96% de la variabilidad de la respuesta. En este caso, el valor R^2 fue lo suficientemente alto como para garantizar un ajuste satisfactorio del modelo propuesto. El valor F del modelo de 7,51 demostró que el modelo aplicado para cada regresión era significativo (valor $p < 005$). La Figura 18 muestra los gráficos de superficie tridimensional (3D) de cada par de los tres factores significativos manteniendo el tercero en su nivel cero. La máxima producción de biomasa predicha se indica en la superficie del diagrama de superficie de respuesta.

La producción de biomasa aumentó con el incremento de SQP (X_1) y KH_2PO_4 (X_5) hasta su punto máximo en torno a los niveles máximos de los dos sustratos (Figura 18, A). Asimismo, la biomasa aumentó con el incremento de SQP y en el nivel medio de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_3) (Figura 18, B). Por último, la producción de biomasa aumentó con el incremento de fosfato diácido de potasio y en el nivel medio de sulfato de amonio (Figura 18, C). Los gráficos de superficie de respuesta obtenidos muestran los mismos resultados obtenidos con la ecuación polinómica de segundo orden. En la figura 18, D se muestran los valores observados de la variable respuesta respecto a los predichos por el modelo, evidenciando un ajuste satisfactorio del modelo.

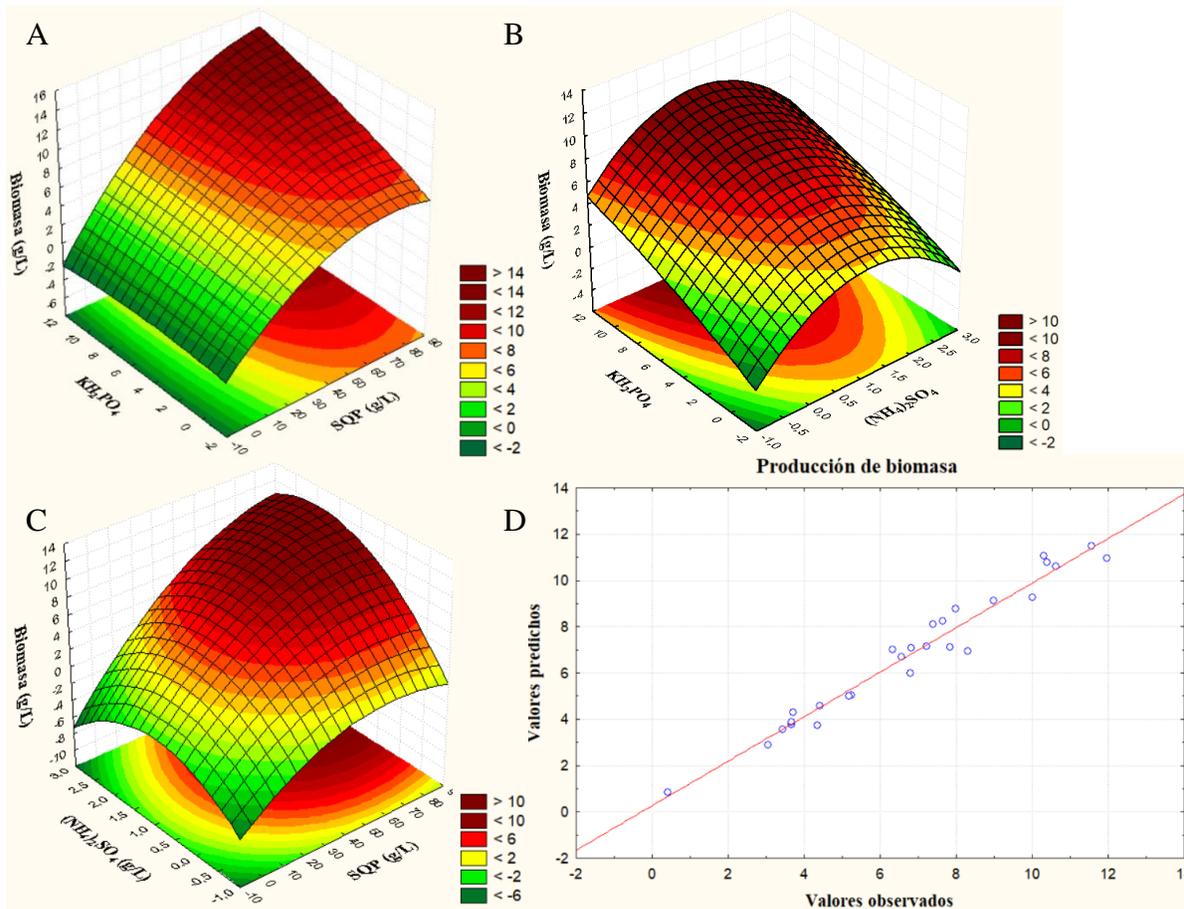


Figura 18. Superficies de respuesta para *V. victorae* analizando la producción de biomasa y los valores predichos frente a los observados. SQP (g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) y KH_2PO_4 (g/L) para la máxima producción de biomasa alcanzada (g/L).

3.1 Validación

Se realizaron seis experimentos para la validación del medio de cultivo óptimo obtenido en el DCC. El tiempo de recolección o cosecha de la biomasa fue de 192 h en Erlenmeyer de 100 mL y 1000 mL, alcanzando una producción de biomasa de $17,3 \text{ g/L} \pm 0,8$ y $17,8 \text{ g/L} \pm 1,0$ respectivamente. Para el biorreactor de 15 L, el tiempo de cultivo fue de 74-78 h con una producción de biomasa de $15,04 \text{ g/L} \pm 0,3$. Con el valor de biomasa máxima obtenida en estos experimentos se calcularon los factores de precisión (A_f) y de sesgo (B_f). El factor A_f proporciona una indicación de la dispersión de los resultados dentro de los valores predichos. El factor B_f es una medida de la desviación media relativa de los valores predichos y observados. Un factor de sesgo de 1 y un factor de precisión de 1

representan un acuerdo perfecto entre los valores observados y los predichos (Bravo et al., 2019; Mellefont et al., 2003).

Los valores A_f y B_f obtenidos fueron 1,13 y 0,91 respectivamente, estos resultados mostraron una discrepancia del 13% y 9% cuando se compararon los valores observados y los predichos. Los valores obtenidos son muy cercanos a 1, sin embargo, un factor de sesgo (B_f) < 1 indica que el modelo predice una producción de biomasa inferior a la obtenida en estos experimentos; un factor de precisión (A_f) > 1 indica que la estimación media entre la producción de biomasa observada y predicha es menos precisa.

4 Determinación de k_{La}

El suministro de oxígeno y transferencia de oxígeno, son parámetros importantes en la producción de este ACB. El k_{La} , depende del reactor, del medio de cultivo y la temperatura utilizada, es por eso que determinar el valor de k_{La} es necesario para llevar a cabo un correcto escalado. Se determinó el k_{La} mediante el método dinámico anteriormente descrito (Figura 19). En primer lugar, se registra de manera gráfica y tabulada el proceso de corte de suministro de oxígeno y de re oxigenación (Figura 19, A). Durante la etapa de suspensión de la aireación, es posible determinar la tasa volumétrica de consumo de oxígeno r_O , ya que el descenso en la concentración de oxígeno disuelto es lineal con respecto al tiempo, el valor de k_{La} es cero y por lo tanto, la Ec. 5 queda como $\frac{dC_{AL}}{dt} = -r_O$ (Figura 19, B). De esta manera se define como r_O a la pendiente de la recta durante esta etapa, con un valor de 0,018 mg O₂/L.seg.

Durante la etapa de re-oxigenación, los datos se ajustan a la mejor función y se obtiene una ecuación polinómica de tercer grado, la cual es derivada analíticamente para obtener $\frac{dC_{AL}}{dt}$ (Figura 19, C). Finalmente la Ec. 5 es reordenada obteniendo otra expresión, $C_{AL} = -\left(\frac{1}{k_{La}}\right)\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + r_O\right) + C_{AL}^*$. Graficando C_{AL} vs. $\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + r_O\right)$ se obtiene un valor de k_{La} de 23,7 h⁻¹ de la pendiente y un valor de C_{AL}^* de 10,93 mg O₂/L de la ordenada al origen (Figura 19, D).

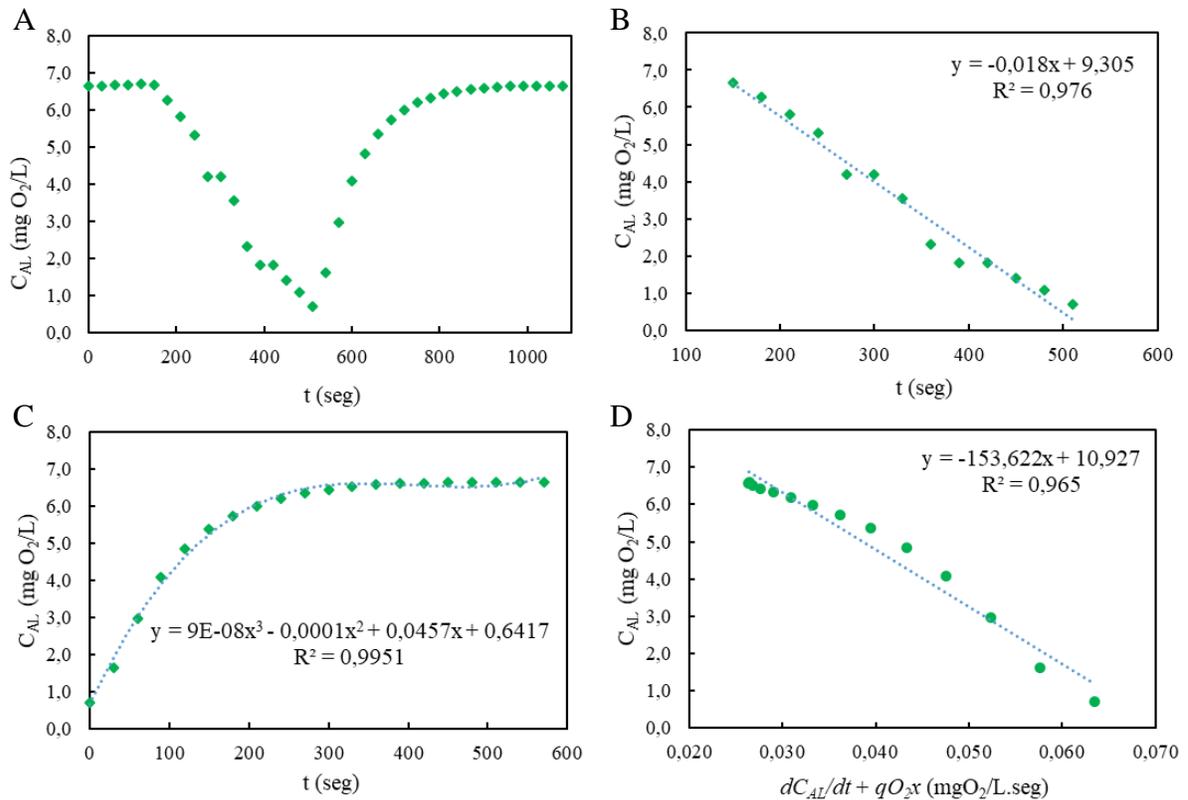


Figura 19. Proceso de medición de k_{LA} . (A) Variación de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo (B) Corte del suministro de aire para determinación de qO_2x . (C) Etapa de re-oxigenación del cultivo. (D) Determinación de k_{LA} mediante la pendiente de la curva.

5 Producción de biomasa de levadura en medio optimizado

Para evaluar el crecimiento de la levadura y la producción de biomasa en el medio de cultivo optimizado a mayor escala, se realizaron tres cultivos *batch* utilizando el biorreactor de 15 L, denominados reactor *batch* 1,2 y 3 (RB1, RB2, RB3) (Figura 20). Los parámetros cinéticos y de producción de biomasa (Tabla 12) muestran que se obtuvieron mejores valores con este medio optimizado con respecto a los datos obtenidos previamente con el medio sin optimizar (Tabla 8), en cuanto a producción de biomasa en peso seco (8,3 g/L en promedio) y productividad volumétrica (0,14 g/L.h en promedio), ya que hubo una reducción en el tiempo total de cultivo y un aumento en la velocidad máxima.

La biomasa se dejó decantar en heladera durante cinco días y luego se concentró por centrifugación, este proceso generó una pérdida de viabilidad del 21% para RB1, 28,8% para RB2 y del 71,5% para RB3. La biomasa se mantuvo conservada en frío durante 40 (RB1), 15 (RB2) y 8 (RB3) días hasta su aplicación

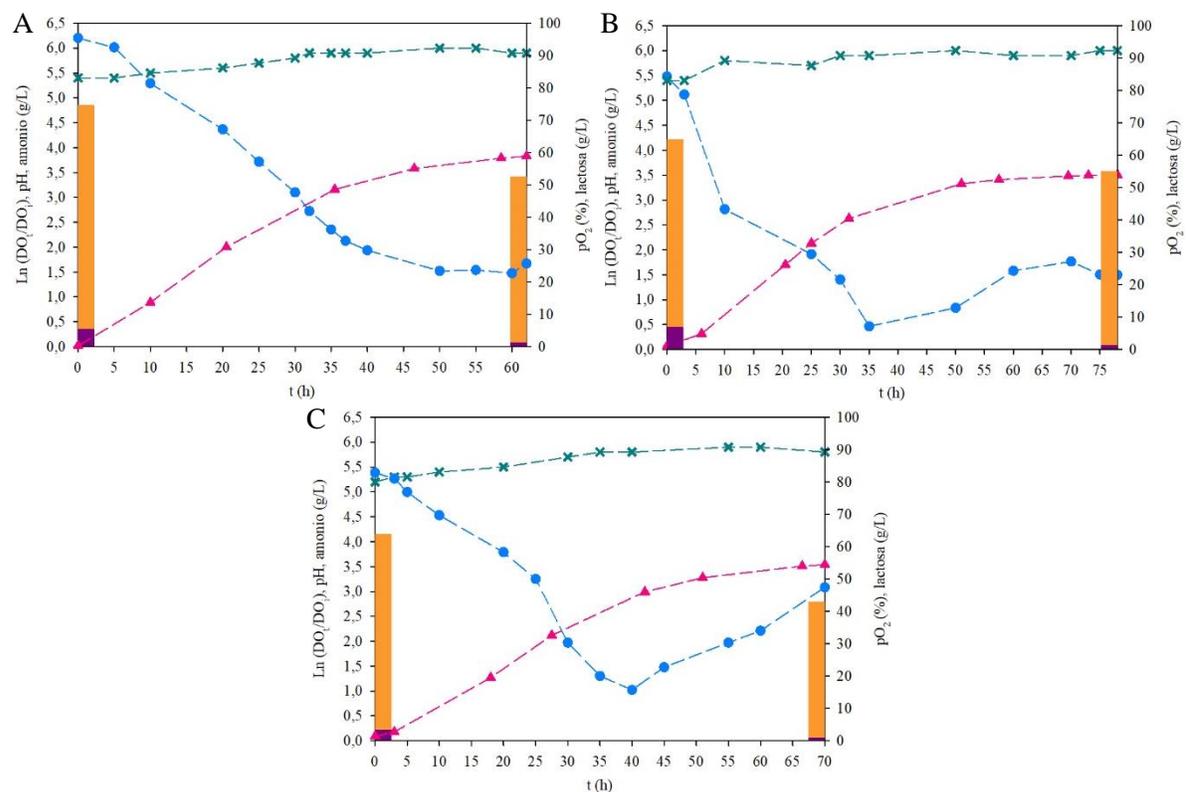


Figura 20. Curvas de crecimiento de tres reactores de *V. victoriae* a 20°C a escala de banco (15 L). Curvas de crecimiento modeladas por el modelo de Gompertz modificado. (A) RB1. (B) RB2. (C) RB3. Amonio (■); lactosa (■); $\ln(DO_t/DO_i)$ (—▲), DO_i : densidad óptica de la levadura al tiempo t , DO_i : densidad óptica inicial de la levadura; pH (—*); pO_2 (—●): porcentaje de presión parcial de oxígeno.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en medio optimizado SQP.

	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción de biomasa			
	A	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	Lag (h)	t (h)	UFC/mL	X (g/L)	$Y_{X/S}$ (g_B/g_S)	P_v (g/L.h)
RB1	3,83	0,083	1,89	62	$7,50 \times 10^8$	9,20	0,42	0,15
RB2	3,73	0,066	4,53	78	$8,00 \times 10^8$	8,59	0,87	0,11
RB3	3,58	0,068	4,49	70	$2,50 \times 10^9$	7,09	0,34	0,10

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: $\ln(DO_f/DO_i)$, 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; P_v : productividad volumétrica. Las curvas fueron modeladas por el modelo de Gompertz.

5.1 Evaluación del ACB con agregado de CaCl₂ a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica

Para evaluar el posible efecto de cloruro de calcio como potenciador de biocontrol de *V. victoriae*, se combinó la biomasa fresca de los tres reactores (Tabla 12) y se aplicó sobre los varietales de pera Packham's Triumph y Beurré D'Anjou. En este ensayo se emplearon bins con 1400-2100 frutas de cada varietal, que desde su cosecha tenían una presión de 12,6 lb y contenido de SS de 12% para el varietal Packham's Triumph, mientras que el varietal Beurré D'Anjou tenían una presión de 13,2 lb y contenido de SS de 11,6%. Se realizaron dos tratamientos para cada varietal de pera, **BF**: biomasa con el agregado de CaCl₂ 2% p/v; **BFS**: biomasa sin el agregado de CaCl₂ 2% p/v. Para calcular el porcentaje de control, los tratamientos nombrados se compararon con un tratamiento **Control** (agua de red).

En los ensayos realizados en el varietal Beurré D'Anjou, luego de 120 días de almacenamiento, se observó que la incidencia natural total de las enfermedades fúngicas alcanzó el 6,31% en el tratamiento control, mientras que para **BF** y **BFS** fue de 1,97% y 2,05% respectivamente (Figura 21, A). En el caso de **BF**, la levadura con adición de CaCl₂ controló un 68,8% el total de las enfermedades fúngicas, correspondiendo un 83,9% a *P. expansum*, 88,5% a *B. cinerea* y 50,1% a *Alternaria-Cladosporium* spp. En el tratamiento que se aplicó levadura sin adición de CaCl₂ (**BFS**) el porcentaje de control total fue de 67,5%, correspondiendo el 68,8% a *P. expansum* y 86,1% a *B. cinerea*, valores ligeramente superiores que para **BF**. El control sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. fue superior, alcanzando el 55% (Figura 21, A).

Luego de 180 días de conservación de la fruta en cámara fría los porcentajes de incidencia de enfermedades fúngicas y la capacidad control de la levadura fueron más evidentes (Figura 21, B). La incidencia natural de enfermedades en el tratamiento control alcanzó el 12,89%, mientras que para **BF** y **BFS** fue de 2,65% y 4,15% respectivamente. Se puede observar que la incidencia de las enfermedades fúngicas en el tratamiento control y en el tratamiento con levadura sin adición de CaCl₂ (**BFS**) aumentó en dos veces luego de 60 días de conservación, en cambio para el tratamiento con levadura con adición de CaCl₂ (**BF**) sólo aumento 1,3 veces. Para **BF** los porcentajes de control alcanzados fueron 85,8% para *P. expansum*, 92,6% para *B. cinerea* y 67% para *Alternaria-Cladosporium* spp., lo que representó un 78% de control total de las podredumbres. En el caso de **BFS**, los porcentajes de control disminuyeron, alcanzando el 65,1% de control total de las podredumbres. El

porcentaje de control de cada fitopatógeno fue: el 70,6% para *P. expansum*, 72,8% para *B. cinerea* y 58% para *Alternaria-Cladosporium* spp (Figura 21, B). A partir de los resultados obtenidos podemos observar que ambos tratamientos lograron reducir la incidencia de las enfermedades fúngicas, observándose una menor incidencia en **BF**, es decir que se genera un efecto sinérgico cuando se combina la levadura con CaCl_2 , aumentando los porcentajes de biocontrol sobre los fitopatógenos.

En los ensayos realizados en el varietal Packham's Triumph se observó luego de 120 días de almacenamiento en el tratamiento control (solo agua) una incidencia total de enfermedades fúngicas del 7,1% (Figura 21, C), en su mayoría causado por *Alternaria-Cladosporium* spp. (5,5%), seguido de *B. cinerea* (0,3%) y *P. expansum* (1,32%). El tratamiento con la levadura con adición de CaCl_2 (**BF**) logró controlar el 41,2% del total de las enfermedades, alcanzando un 53,3% de control para *B. cinerea*, 58,4% a *P. expansum* y 36,4% para *Alternaria-Cladosporium* spp. En cambio, en el tratamiento con la levadura sin adición de CaCl_2 (**BFS**), solo se observó un 30,1% de control sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 21, C). Luego de 180 días de almacenamiento, el porcentaje de incidencia total de podredumbres en el tratamiento control alcanzó el 8,57% (Figura 21, D). El tratamiento con la levadura con adición de CaCl_2 (**BF**) logró controlar en un 42,5% el total de las enfermedades, alcanzando un control del 37,7% para *B. cinerea*, 57,9% a *P. expansum* y 39,4% para *Alternaria-Cladosporium* spp. Por otro lado, el tratamiento de la levadura sin adición de CaCl_2 (**BFS**) solo mostró un 15,4% de control sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 21, D). Estos resultados demuestran el efecto sinérgico del CaCl_2 en combinación con la levadura ya que los porcentajes de control obtenidos en los **BF** son mayores que en **BFS**.

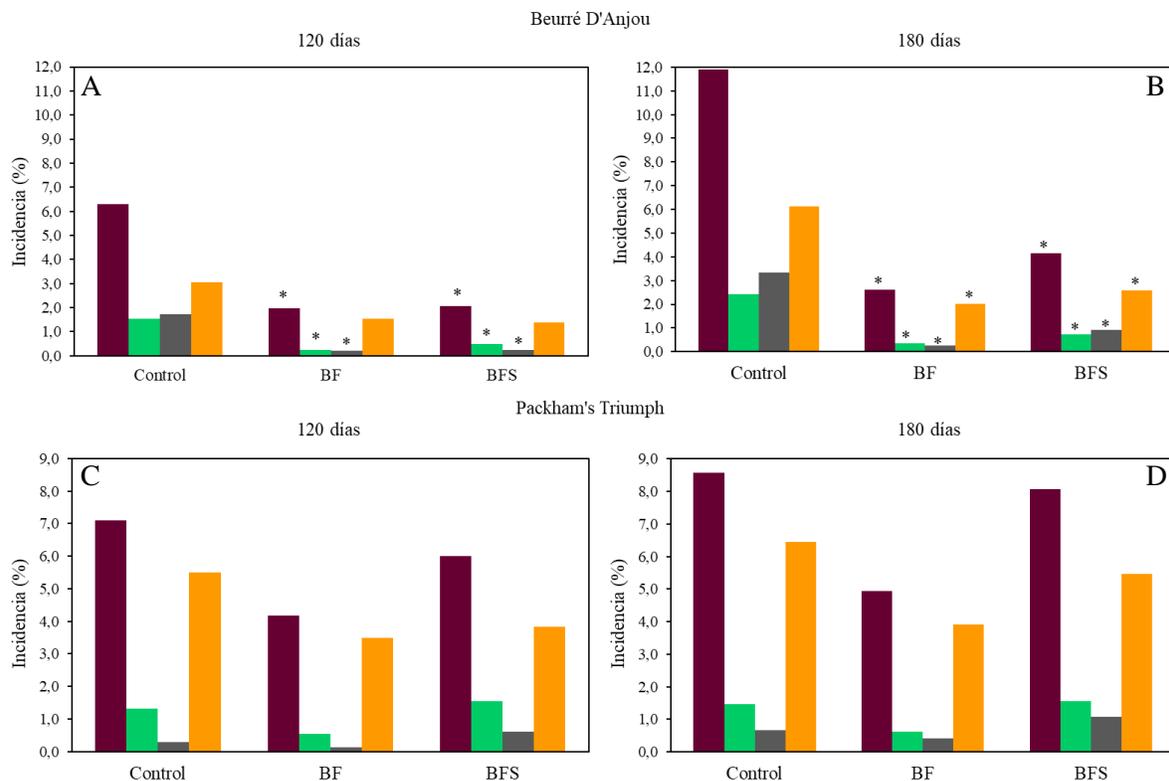


Figura 21. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total de podredumbres tras 120 (A y C) y 180 (B y D) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Beurré D'Anjou (A y B) y Packham's Triumph (C y D). Tratamientos: biomasa con el agregado de CaCl_2 2% p/v (**BF**): biomasa sin el agregado de CaCl_2 2% p/v (**BFS**). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

5.2 Efecto del sistema de aplicación sobre la viabilidad de las levaduras

Debido a la disminución de la viabilidad de las levaduras al pasar por el sistema de aplicación por pulverización utilizado (Tabla 9), se decidió cambiar el sistema de aplicación en los siguientes ensayos para evitar estas pérdidas. Este nuevo sistema de aplicación consistió en un tubo de PVC perforado. Las levaduras fueron preparadas a una concentración inicial del orden de 10^8 UFC/mL en un tanque conectado a dicho tubo y por gravedad se logró el rociado de las levaduras sobre la superficie de la fruta (Figura 22). Con el objetivo de evaluar si este sistema de aplicación influye en la viabilidad de la levadura aplicada en línea de empaque, se tomaron muestras en el tanque de aplicación y a la salida del sistema de aplicación (Tabla 13).

Los resultados muestran que la viabilidad de las levaduras disminuye en un orden de magnitud en el tratamiento **T2** sobre el varietal Packham's Triump, en el tratamiento **T1** para ambos varietales y en tratamiento **T2** sobre el varietal Beurre D'Anjou no se observa una disminución significativa de la viabilidad al pasar por el sistema de aplicación.



Figura 22. Sistema de aplicación de tubo de PVC perforado.

Tabla 13. Efecto del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de las levaduras *V. victoriae*.

Tratamiento	T1		T2	
	Packham's Triump	Beurre D'Anjou	Packham's Triump	Beurre D'Anjou
Tanque (UFC/mL)	2,00x10 ⁸ a	1,97x10 ⁸ a	1,78x10 ⁸ a	2,72x10 ⁸ a
Pico (UFC/mL)	1,37x10 ⁸ a	1,31x10 ⁸ a	1,28x10 ⁷ b	2,18x10 ⁸ a

Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

6 Evaluación de diferentes técnicas para la formulación del ACB

6.1 Formulación líquida

La conservación de la biomasa a 4°C mostró valores bajos de viabilidad con todos los crioprotectores en comparación a los valores obtenidos a -20°C (Tabla 14). Se observó que el método de conservación en GMS a -20°C fue el mejor, ya que mostró un 37,9% de supervivencia de la biomasa luego de 30 días de conservación, mientras que el glicerol y el sorbitol mostraron solo un 4,6% y un 6,7% de viabilidad respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14. Supervivencia a la conservación en frío utilizando tres crioprotectores a tres temperaturas luego de 30 días de almacenamiento.

Temperatura	Viabilidad (%)		
	GMS* (1% v/v)	Sorbitol (15% v/v)	Glicerol (10% v/v)
4°C	10,0	0,6	1,2
-20°C	37,9	6,7	4,6

* glutamato monosódico

6.2 Formulación seca

Se realizaron ensayos para buscar un método de conservación de las levaduras secas, ya que como levadura seca activa (LSA) se facilitaría el manejo comercial y conservación hasta la aplicación en fruta. En primer lugar, la biomasa se liofilizó utilizando GMS (1% v/v) y sorbitol (1% v/v). Antes del proceso de liofilización la biomasa tenía una concentración de células vivas de $5,6 \times 10^9$ UFC/mL, luego de este proceso se cuantificaron $4,1 \times 10^9$ UFC/mL, por lo tanto, la biomasa mantuvo el 73% de su viabilidad inicial.

Posteriormente, el mejor crioprotector seleccionado se combinó con dos agentes protectivos: suero de queso en polvo (SQP) y leche descremada en polvo (LDP), ambos al 30% p/v. Se comparó la viabilidad de las levaduras luego del proceso de liofilización y durante el período de conservación para seleccionar la mejor combinación crioprotector/agente protectorio (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de viabilidad de las LSA por liofilización tras diferentes periodos de almacenamiento utilizando diferentes formulados.

Tiempo (días)	Viabilidad (%)			
	GMS (1%) + SQP (30% p/v)		GMS (1%) + LDP (30% p/v)	
	Promedio	DS ±	Promedio	DS ±
0	100a	10,53	100a	17,21
30	74,00a	13,25	96,67b	10,89
60	73,68a	12,15	80,00a	12,77
90	68,42a	6,08	46,67b	7,70

DS: desvió estándar. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Se observó una marcada diferencia entre la eficacia de los distintos agentes protectivos para mantener la viabilidad de la biomasa durante el almacenamiento. La

biomasa inicial antes de la liofilización fue de $9,56 \times 10^{10}$ UFC/mL, tras el proceso fue de $9,5 \times 10^7$ UFC/mL utilizando SQP + GMS (0,1% viabilidad) y de $7,5 \times 10^7$ UFC utilizando LDP + GMS (0,08% viabilidad). El glutamato monosódico en combinación con SQP mostró una supervivencia de la levadura como LSA significativamente mejor en comparación con su combinación con LDP tras 90 días de conservación (Tabla 15).

7 Ensayos a escala semicomercial en empaque orgánico de la levadura fresca y liofilizada producida en diferentes configuraciones de reactor

Se evaluó sobre el varietal de pera Packham's Triumph la capacidad antagónica de levaduras crecidas y conservadas por diferentes procesos: en *batch* como LSA y en reactor semicontinuo como levadura fresca. Por otro lado, se evaluó la influencia del tipo de suero de queso empleado en el medio de cultivo, comparando tanto la productividad de biomasa obtenida y la capacidad antagónica de la levadura durante el ensayo en línea.

7.1 Producción de biomasa como LSA en reactor *batch* con SQP

Para evaluar la biomasa como LSA en un ensayo a escala semicomercial, la producción de biomasa se realizó en dos cultivos *batch* utilizando el biorreactor de 15 L (Figura 23). La curva de crecimiento de la levadura alcanzó la fase estacionaria tras 74 h de cultivo en el reactor 1 (RB1), con una producción total de biomasa de $1,08 \times 10^9$ UFC/mL; el reactor 2 (RB2) produjo $3,5 \times 10^9$ UFC/mL en las 78 h de cultivo. El pO_2 y el pH fueron similares en ambos reactores (Figura 23, A-B). Se determinaron los parámetros cinéticos y de producción de biomasa (Tabla 16). Se observó en los parámetros de producción una mayor concentración de biomasa y P_v cuando se comparan con los resultados obtenidos en reactores *batch* anteriores (Tabla 12), mientras que el recuento de viables, y los parámetros cinéticos son similares. La biomasa se dejó decantar en heladera durante cinco días y luego se concentró por centrifugación, este proceso generó una pérdida de viabilidad del 75,5% para RB1 y del 77,8% para RB2.

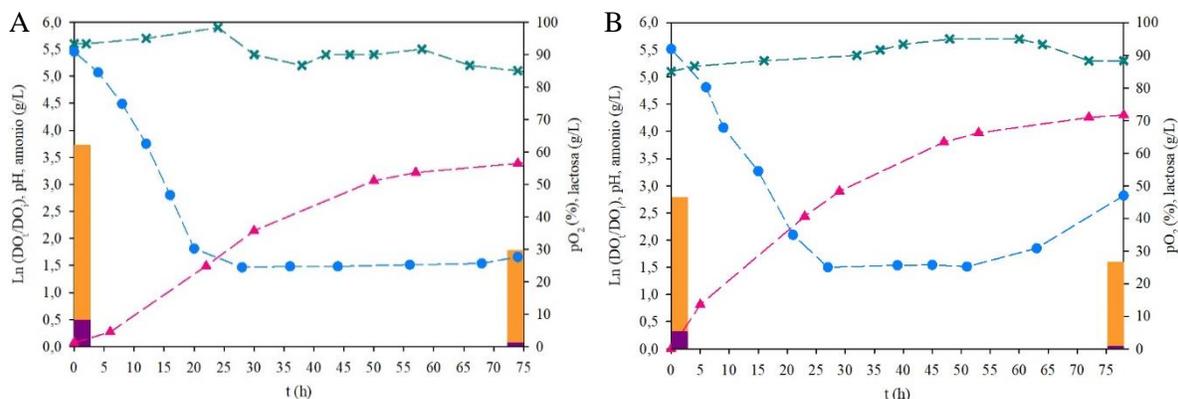


Figura 23. Curvas de crecimiento de los dos reactores de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco (15 L). Curvas de crecimiento modeladas por el modelo de Gompertz modificado. (A) RB1. (B) RB2. Amonio (■); lactosa (■); Ln(DO_t/DO_i) (—▲—), DO_t: densidad óptica de la levadura al tiempo t, DO_i: densidad óptica inicial de la levadura.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en medio optimizado SQP.

Reactor	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/mL	X (g/L)	Y _{X/S} (g _B /g _S)	P _v (g/L.h)
RB1	3,45	0,09	3,47	82	1,08x10 ^{9a}	14,77 ^a	0,44 ^a	0,20 ^a
RB2	4,28	0,09	4,41	78	3,50x10 ^{9a}	15,30 ^a	0,77 ^b	0,20 ^a

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DO_f/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 /g de sustrato consumido; P_v: productividad volumétrica. Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p < 0,05).

La biomasa producida en RB1 se almacenó en heladera durante 60 días hasta su aplicación. La biomasa producida en el reactor 2 (RB2) se liofilizó utilizando la combinación definida anteriormente (GMS 1% p/v + SQP 30% p/v). Antes del proceso de liofilización, la biomasa concentrada tenía 7,33x10⁹ UFC/mL, luego de ser sometida a la liofilización la viabilidad fue de 2,33x10⁸ UFC/mL (3,2% de viabilidad). Luego de 10 meses de conservación, la viabilidad de las levaduras disminuyó en un orden de magnitud (5,15x10⁷ UFC/mL) (Tabla 17).

Tabla 17. Viabilidad celular de *V. victoriae* conservada por liofilización tras diferentes periodos de almacenamiento utilizando GMS y SQP.

Tiempo (días)	Viabilidad (%)	DS ±
0	100	7,04
60	42,02	2,43
180	64,31	8,20
300	22,08	3,33

DS: desviación estándar.

7.2 Evaluación de SQP proteico para la producción de biomasa

Con el objetivo de evaluar otra calidad de SQP, llamado suero de queso proteico (SQPP) en cultivo semicontinuo. El cultivo alcanzó en 195 h la fase estacionaria, con dos alimentaciones a las 75 y 120 h, alcanzando un volumen final de producción de 14 L. Se determinaron las UFC/mL en diferentes tiempos de cultivo y al final del cultivo se alcanzó un valor de $9,30 \times 10^{11}$ UFC/ mL (Figura 24).

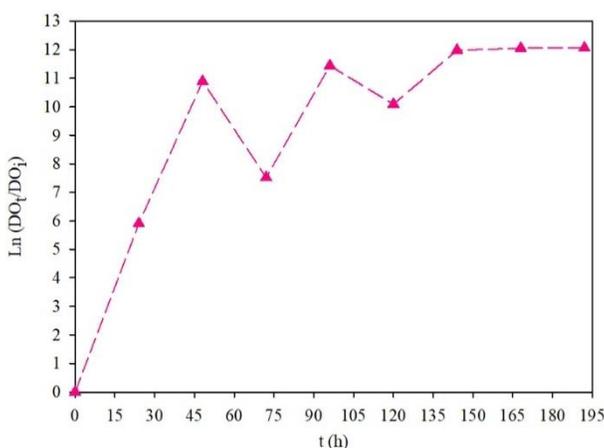


Figura 24. Curvas de crecimiento del cultivo en reactor semicontinuo de *V. victoriae*. Ln(DO_t/DO_i) (—▲—).

La biomasa obtenida se liofilizó utilizando GMS 1% p/v como crioprotector y LDP 30% p/v como agente protector. Se obtuvieron 0,715 kg de biomasa total liofilizada la cual fue almacenada durante 120 días a 20°C hasta su aplicación en un empaque regional con manejo orgánico. La viabilidad de biomasa liofilizada se redujo en un 82,4% en comparación con la cantidad inicial en estado fresco. Durante la conservación la viabilidad pasó de $1,64 \times 10^{12}$ UFC/g a $8,12 \times 10^9$ UFC/g, cantidad suficiente para realizar su aplicación a escala comercial para 1500 kg de fruta.

7.3 Ensayos a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica de la levadura fresca y liofilizada

Se realizó sobre peras del varietal Packham's Triumph la aplicación a escala semicomercial de la biomasa de *V. victoriae* en diferentes presentaciones para evaluar eficacia como ACB. Cada bins tratado contenía 1300-1600 frutas, que desde su cosecha tenían una presión de 13,5 lb y contenido de SS de 13%.

La biomasa fue producida en dos sistemas de cultivo: i) reactor *batch*, tanto fresca (**BF**) y liofilizada-rehidratada (**BLR**), y ii) en reactor semicontinuo liofilizada-rehidratada (**BLR-P**). En todos los tratamientos con las levaduras fue agregado CaCl_2 2% p/v. Se determinó la eficacia del biocontrol por comparación con el tratamiento **Control** luego de 90 y 150 días de almacenamiento en frío de la fruta (Figura 25).

La incidencia natural total de las podredumbres en el tratamiento control fue del 1,23% después de 90 días de almacenamiento en cámara frigorífica (Figura 25, A), los tratamientos con el ACB fresco y liofilizado redujeron la incidencia total: 6% para **BF**, 52% para **BLR** y 44% para **BRL-P**. El tratamiento **BF** controló 26,4% a *P. expansum*. El tratamiento **BLR** controló el 100% de incidencia causada por *B. cinerea*, el 65% de incidencia causada por *P. expansum*, pero no se observó control para *Alternaria-Cladosporium* spp. Por otro lado, la levadura desarrollada en el sistema semicontinuo (tratamiento **BLR-P**) controló el 5,4% la enfermedad causada por *B. cinerea*, el 41,8% a *P. expansum* y el 68,5% de control sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 25, A).

Tras 150 días de almacenamiento, la incidencia total de las enfermedades fúngicas alcanzó el 4,06% en el tratamiento control (Figura 25, B). El tratamiento **BF** alcanzó el 47% y el 58% del control para *B. cinerea* y *P. expansum*, pero no se observó ningún control para *Alternaria-Cladosporium* spp. El tratamiento con **BLR** redujo la incidencia causada por *B. cinerea*, *P. expansum* y *Alternaria-Cladosporium* spp., alcanzando el 36%, 71% y 55% del control respectivamente. Por último, el tratamiento **BLR-P** redujo el porcentaje de control sobre *B. cinerea* a un 14,9%, los porcentajes de control sobre *P. expansum* y *Alternaria-Cladosporium* spp. fueron del 65,2% y 88,2% respectivamente (Figura 25, B).

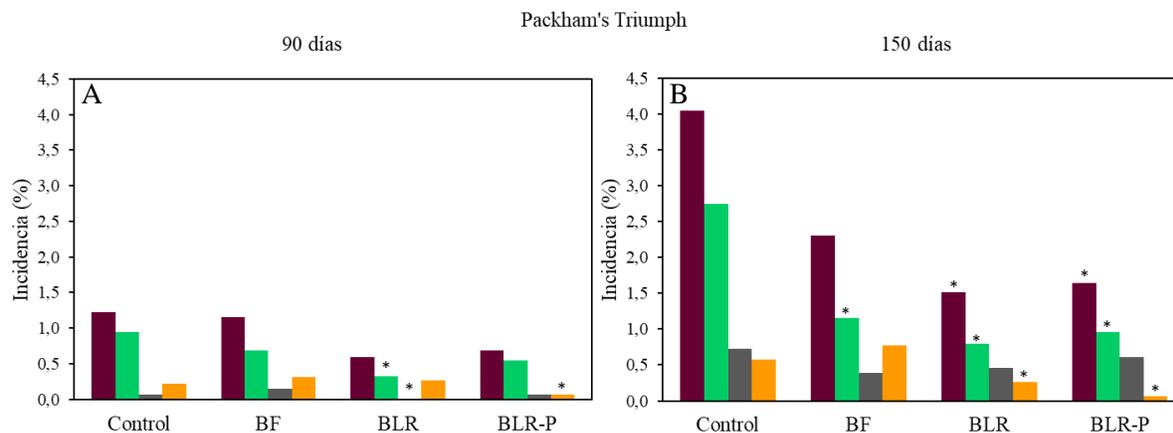


Figura 25. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total tras 90 (A) y 150 (B) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Packham's Triumph. Tratamientos: biomasa fresca (BF) y liofilizada-rehidratada (BLR) producida en reactor *batch* y biomasa liofilizada-rehidratada producida en reactor semicontinuo (BLR-P). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

7.4 Aplicación y colonización de las levaduras en la superficie de la fruta almacenada en frío

Se evaluó la cantidad de levaduras viables en cada tratamiento antes de la aplicación y en el agua pulverizada mediante el sistema de aplicación de tubo de PVC perforado (Tabla 18). Las cantidades de levaduras aplicadas en los tratamientos BF y BLR en la línea de empaque se redujeron en aproximadamente un orden de magnitud con respecto al número inicial en el agua de tanque (Tabla 18). En el tratamiento BLR-P no hubo una reducción de la viabilidad cuando la levadura pasó a través del sistema de aplicación, sin embargo, en los dos tratamientos donde la levadura se aplicó liofilizada-rehidratada hay diferencias significativas entre los valores obtenidos antes y después de pasar por el sistema de aplicación (Tabla 18).

Con el objetivo de evaluar si la levadura fresca y liofilizada tiene la capacidad de crecer sobre la superficie de la fruta durante el período de almacenamiento, se evaluó la viabilidad a lo largo del mismo. Al inicio del ensayo, la superficie de la pera contenía una media de $4,77 \times 10^4$ UFC/fruto ($3,42 \times 10^2$ UFC/cm²) con BF, $6,45 \times 10^4$ UFC/fruto ($4,62 \times 10^2$ UFC/cm²) con BLR y $3,38 \times 10^4$ UFC/fruto ($2,4 \times 10^2$ UFC/cm²) con BLR-P. Se observó un crecimiento exponencial en BLR durante los primeros 30 días de conservación, luego se mantuvo constante hasta los 150 días de conservación en frío, aumentando el número de

células por superficie en 2,8 unidades logarítmicas ($7,33 \times 10^3$ UFC/cm²). Por otro lado, en el tratamiento **BF** el número de células de levadura creció lentamente durante el periodo de conservación aumentando en aproximadamente 2,2 unidades logarítmicas a los 150 días ($3,15 \times 10^3$ UFC/cm²). En el caso del tratamiento **BLR-P**, a pesar de tener más concentración de levaduras inicial (Tabla 18), se observó una fase *lag* en los primeros 30 días de conservación, seguido por una etapa de crecimiento exponencial durante los 30 y 90 días. Finalmente, durante la última etapa de conservación (120 días), el número de células alcanzó la fase estacionaria aumentando en 3,2 unidades logarítmicas la concentración ($6,03 \times 10^3$ UFC/cm²), siendo el tratamiento que alcanza la mayor concentración de UFC/cm² (Figura 26).

Tabla 18. Efecto del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de *V. victoriae*.

Tratamiento	BF	BLR	BLR-P
Tanque (UFC/mL)	$3,73 \times 10^7$ a	$1,69 \times 10^7$ a	$3,26 \times 10^7$ a
Pico (UFC/mL)	$2,25 \times 10^6$ a	$5,72 \times 10^6$ b	$1,29 \times 10^7$ b

Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

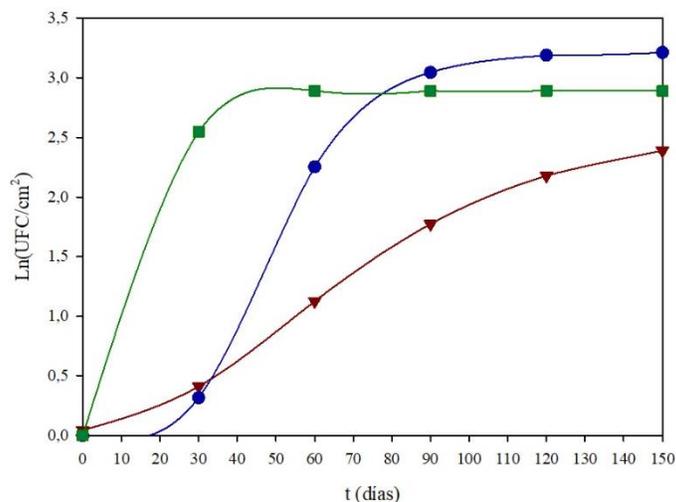


Figura 26. Crecimiento sobre la superficie de la fruta ($\text{Ln}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$) durante el período de conservación en cámara frigorífica. Varietal Packham's Triumph: **BF** (▼), **BLR** (■), **BLR-P** (●).

8 Producción de biomasa en reactor con dos configuraciones: *batch* y *semicontinuo*: evaluación en línea de empaque convencional

Con el objetivo de comparar el crecimiento de la levadura y su efectividad antagónica con la producción de biomasa en reactor semicontinuo (RSC), se realizaron ensayos en una línea de empaque de manejo diferente. El ensayo se llevó a cabo en una empresa con producción convencional de frutas, que utiliza CAPTAN® 0,2% v/v y CERCOBIN® 0,15% v/v.

8.1 Producción de biomasa en reactor *batch*

Para poder producir la cantidad de biomasa para aplicar en dos variedades de fruta, se llevaron a cabo dos cultivos *batch* utilizando el biorreactor de 15 L (Figura 27). El reactor *batch* 1 (RB1) y el reactor *batch* 2 (RB2) tuvieron un comportamiento similar y alcanzaron valores similares en sus parámetros cinéticos y de producción (Tabla 19). La biomasa se concentró utilizando el filtro tangencial, proceso que tomó cinco días para cada reactor, proceso en el cual la viabilidad cayó en un 90,3% en RB1 y 65,2% en RB2.

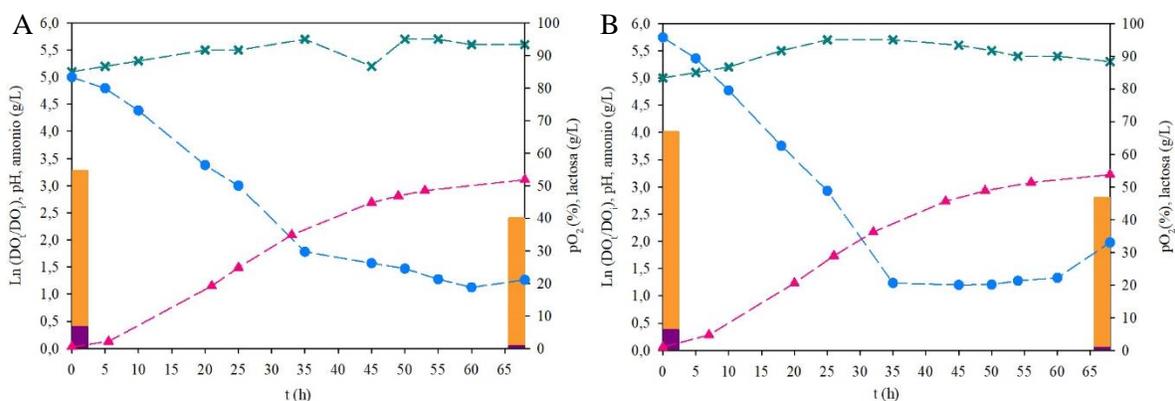


Figura 27. Curvas de crecimiento de los dos reactores de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco (15 L). Curvas de crecimiento modeladas por el modelo de Gompertz modificado. (A) RB1. (B) RB2. Amonio (■); lactosa (■); $\ln(DO_t/DO_i)$ (—▲—), DO_t : densidad óptica de la levadura al tiempo t, DO_i : densidad óptica inicial de la levadura; pH (—×—); pO_2 (—●—): porcentaje de presión parcial de oxígeno.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en medio optimizado SQP.

Reactor	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)	P _v (g/L.h)
RB1	3,14	0,06	7,74	68	1,60x10 ⁹	9,52	0,62	0,14
RB2	3,17	0,06	5,60	68	2,75x10 ⁹	9,80	0,49	0,14

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DO_f/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; P_v: productividad volumétrica.

Para obtener la cantidad suficiente de LSA y sabiendo que durante el proceso de liofilización se pierde al menos un orden de magnitud, la biomasa obtenida en ambos reactores se combinó y liofilizó con GMS 1% p/v y SQP o LDP 30% p/v. La viabilidad de biomasa liofilizada, determinada al día de finalizar el proceso, se redujo en un 82,6% en comparación con la cantidad inicial en estado fresco (2,18x10⁹ UFC/mL a 3,79x10⁸ UFC/mL). La LSA se almacenó a 20°C durante 60 (RB1) y 30 (RB2) días hasta su aplicación a escala comercial durante la temporada 2022. Una pequeña cantidad de la biomasa liofilizada se guardó para determinar su viabilidad durante el tiempo de almacenamiento (Tabla 20 y 21). La viabilidad de los liofilizados resulta ser muy variable; para RB1 la combinación GMS-SQP conserva una mayor viabilidad a lo largo de los 180 días de almacenamiento. Por otro lado, para RB2 durante los primeros 90 días la misma combinación (GMS-SQP) es la más adecuada. Sin embargo, luego de 150 días, la viabilidad es mayor utilizando GMS-LDP.

Tabla 20. Viabilidad de la biomasa de *V. victoriae* producida en RB1, empleando GMS 1% p/v como crioprotector y SQP y LDP como protectivos.

Tiempo (días)	RB1			
	SQP 30% p/v		LDP 30% p/v	
	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)
0	100a	21,80	100a	19,03
30	92,45a	18,68	31,15b	6,67
60	62,52a	5,51	49,601a	14,79
90	49,31a	6,18	8,08b	3,49
150	25,75a	13,10	6,23b	1,38
180	12,33a	3,05	5,08b	1,06

DS: desvío estándar. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p < 0,05).

Tabla 21. Viabilidad de la biomasa de *V. victoriae* producida en RB2, empleando GMS 1% p/v como crioprotector y SQP y LDP como protectivos.

RB2				
Tiempo (días)	SQP 30% p/v		LDP 30% p/v	
	Viabilidad (%)	DS (\pm)	Viabilidad (%)	DS (\pm)
0	100a	19,69	100a	23,72
30	78a	14,36	66,94a	14,73
60	90	35,50	ND	-
90	87a	24,65	38,02b	7,47
150	24,50a	2,29	34,71b	5,73

DS: desvío estándar. ND: no determinado. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

8.2 Producción de biomasa en reactor semicontinuo

Se evaluó el sistema de configuración semicontinuo (RSC) para producción de biomasa en el reactor de 15 L empleando SQP como base del medio de cultivo, ya que se habían tenido buenos resultados con un reactor de 7 L y con SQPP (Figura 24). Con este sistema semicontinuo en 105 h se alcanzó un volumen final de producción de 27 L. Se determinaron los parámetros cinéticos y de producción de biomasa en cada una de las alimentaciones y al final del cultivo (Tabla 22). Por último, la biomasa se concentró utilizando el filtro tangencial durante seis días, proceso en el cual perdió el 90,2% de viabilidad. Se almacenó en heladera durante 28 días hasta su aplicación.

Tabla 22. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en reactor semicontinuo con medio optimizado SQP.

Reactor	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)	P_v (g/L.h)
RB1	2,69	0,08	6	105	$2,90 \times 10^{10}$	6,17	0,48	0,08
RB2	3,03	0,06	-			7,71	0,77	
RB3	3,09	0,02	-			10,17	0,06	
RB4	2,91	0,02	-			8,41	0,15	

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: $\text{Ln}(\text{DO}_f/\text{DO}_i)$, 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; P_v : productividad volumétrica.
*La suma de lo obtenido en cada uno de los *batch* del cultivo semicontinuo.

El porcentaje de oxígeno disuelto fue mantenido por encima del 20% y al final del cultivo fue de 26,8% (Figura 28). El consumo total de azúcares fue de 36,7 g/L y de

nitrógeno libre de 0,54 g/L, observándose un mayor consumo en la primera y última etapa de cultivo (Figura 28). La producción de biomasa promedio fue de 8,2 g/L. La concentración de azúcares, amonio y oxígeno aumentan con cada recambio de medio de cultivo, mientras que la concentración de biomasa disminuye (Figura 28).

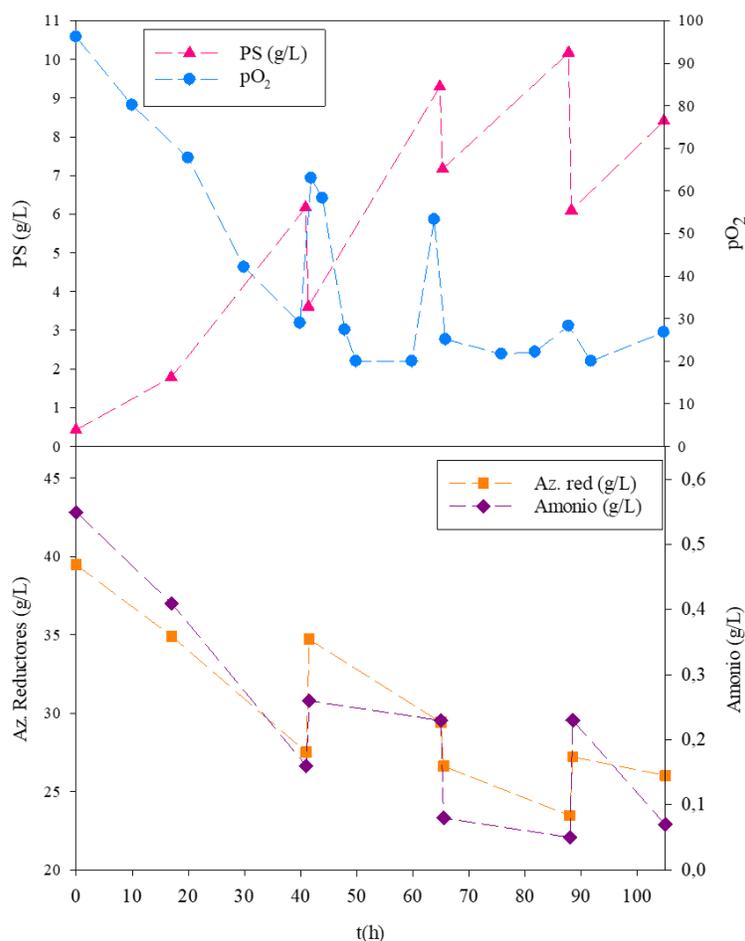


Figura 28. Producción de biomasa en reactor semicontinuo de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco en medio optimizado. pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno.

8.3 Ensayos a escala semicomercial en línea de empaque de producción convencional

Este ensayo en el empaque de producción de fruta convencional se realizó para evaluar la efectividad de *V. victoriae* como ACB en este tipo de fruta y el acondicionamiento fisiológico del ACB crecido en las diferentes configuraciones de producción de biomasa (*batch* y semicontinuo), tanto fresca como liofilizada. Se realizaron dos tratamientos, **BF**: biomasa fresca crecida en reactor semicontinuo y **BLR**: biomasa

lío-filizada-rehidratada crecida en reactor *batch*, ambos tratamientos con el agregado de CaCl₂ 2% p/v sobre peras de varietal Packham's Triumph y manzanas de varietal Red Delicious. Cada bins de Packham's Triumph tratado contenía entre 1600-1800 frutas y cada bins de Red Delicious entre 1000-1400 frutas. Para calcular el porcentaje de control, los tratamientos nombrados se compararon con un tratamiento **Control** (agua de red + CaCl₂ 2% p/v).

Luego de 150 días de conservación, la incidencia de enfermedades fúngicas naturales en el varietal Packham's Triumph fue de 1,10% en total, tanto para el tratamiento control como para **BF** y de 1,13% para el tratamiento **BLR** (Figura 29, A). El tratamiento **BF** logró controlar a *B. cinerea* en un 100%, el tratamiento **BLR** controla a *B. cinerea* en un 59,2% y a *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 100%, mientras que ninguno de los tratamientos logró controlar a *P. expansum*. Luego de 180 días de conservación, la incidencia total de enfermedades fúngicas en el tratamiento control alcanzó el 1,77%, mientras que en **BF** y en **BLR** fue de 2,14% y 1,58% respectivamente (Figura 29, B). El tratamiento **BF** logró controlar a *B. cinerea* en un 35,2%, el tratamiento **BLR** controla a *B. cinerea* en un 49% y a *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 66%.

Para el caso de las manzanas Red Delicious, la incidencia natural total de enfermedades fúngicas a los 150 días de almacenamiento fue de 0,53% en el tratamiento control, 0,87% y 0,39% en **BF** y **BLR** respectivamente (Figura 29, C). El tratamiento **BF** controló únicamente a *B. cinerea* en un 2% y el tratamiento **BLR** en un 100% al mismo fitopatógeno. Luego de 180 días, los porcentajes de incidencia de podredumbres se elevaron a 1,33% en el tratamiento control, 1,56% en **BF** y 1,58% en **BLR** (Figura 29, D). El porcentaje de control para *B. cinerea* aumentó a 35,2% en el tratamiento **BF** y alcanzó el 49% en el tratamiento **BLR**. No se observó incidencia de *Alternaria-Cladosporium* spp. durante todo el período de conservación. Los porcentajes de incidencia de podredumbres de los tratamientos **BF** y **BLR** no muestran diferencias significativas con respecto al tratamiento control.

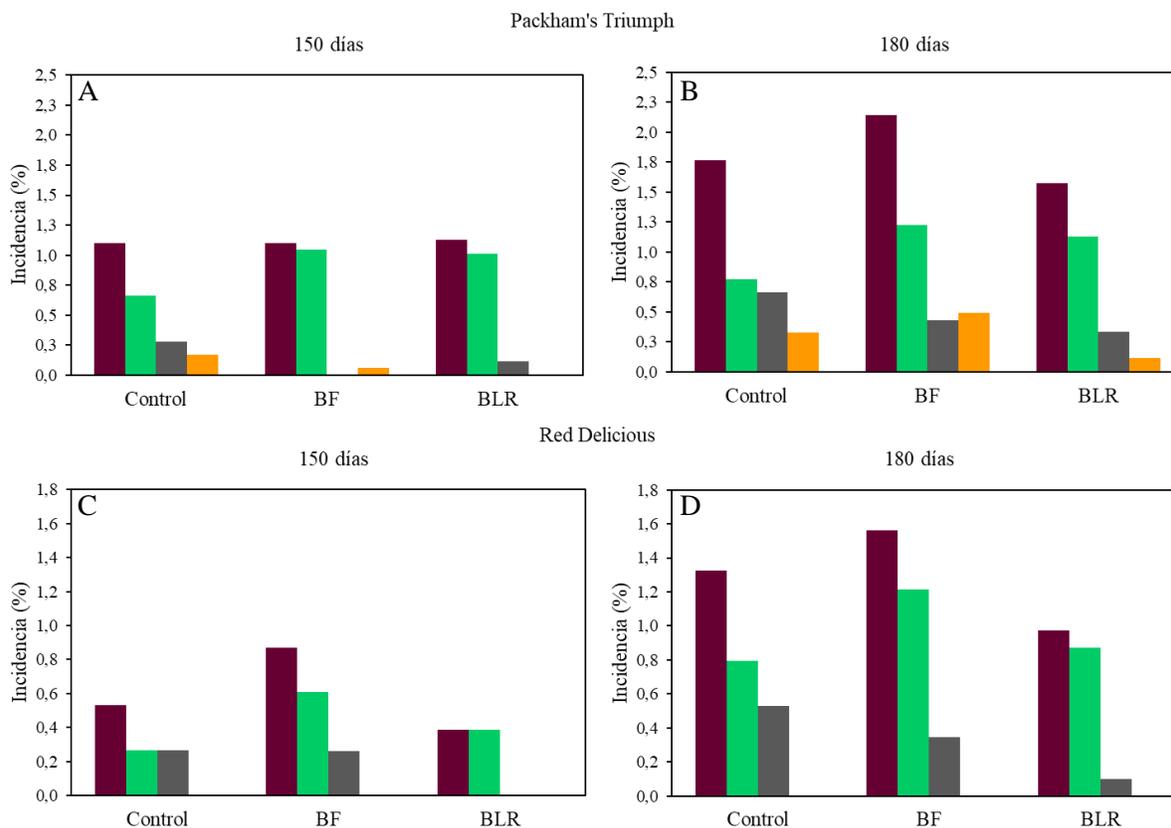


Figura 29. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total de podredumbres tras 150 (A y C) y 180 (B y D) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Packham's Triumph (A y B) y Red Delicious (C y D). Tratamientos: biomasa fresca crecida en el RSC (**BF**); biomasa liofilizada-rehidratada crecida en RB (**BLR**). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■).

8.4 Aplicación del ACB y colonización de las levaduras en la superficie de la fruta almacenada en frío.

Las levaduras viables iniciales aplicadas en los tratamientos **BF** y **BLR** en la línea de empaque conservaron su viabilidad cuando pasaron a través del sistema de aplicación de tubo de PVC perforado, ya que no se redujeron de manera significativa (Tabla 23) sobre los dos varietales. Sobre la superficie de la pera al inicio del tratamiento había un promedio de $2,7 \times 10^3$ UFC/fruto ($5,4 \times 10^1$ UFC/cm²) con el tratamiento **BF** y $2,34 \times 10^3$ UFC/fruto ($4,67 \times 10^1$ UFC/cm²) con tratamiento **BLR**. En el caso de la manzana Red Delicious al inicio del ensayo, en la superficie había un promedio de $2,83 \times 10^3$ UFC/fruto ($5,67 \times 10^1$ UFC/cm²) con el tratamiento **BF** y $9,05 \times 10^3$ UFC/fruto ($1,81 \times 10^2$ UFC/cm²) con el tratamiento **BLR**. Los valores de UFC/cm² disminuyeron progresivamente durante los 180

días de conservación. En el caso del tratamiento **BF**, los recuentos descienden a 25 UFC/cm², mientras que en el tratamiento **BLR** descienden a 11 UFC/cm².

Tabla 23. Efecto del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de las levaduras y concentración de *V. victoriae*.

Tratamiento	BF		BLR	
	Packham's Triump	Red Delicious	Packham's Triump	Red Delicious
Tanque (UFC/mL)	2,00x10 ⁵ a	1,25x10 ⁵ a	6,90x10 ⁵ a	4,10x10 ⁵ a
Pico (UFC/mL)	1,15x10 ⁵ a	1,25x10 ⁵ a	6,70x10 ⁵ a	3,70x10 ⁵ a

Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

9 Producción de biomasa de ACB en reactor con dos configuraciones: *batch* 100 L y semicontinuo, evaluación en línea de empaque orgánica

Se demostró anteriormente que la producción de biomasa en RSC permite obtener mejores resultados en cuanto a producción de biomasa y reducción de tiempos muertos en comparación con el reactor *batch*. Por este motivo, se llevó a cabo un nuevo RSC para producir biomasa con el objetivo de poder comparar la producción de biomasa en esta configuración de reactor con la producción en reactor *batch* a escala piloto (100 L) y realizar nuevamente ensayos en línea sobre fruta orgánica.

9.1 Producción de biomasa de ACB en RSC en medio optimizado

Se determinaron los parámetros cinéticos y de producción de biomasa en el RSC para cada una de las alimentaciones y al final del cultivo (Tabla 24). En comparación con el RSC anterior (Tabla 22), el mostrado en este apartado obtuvo mayor concentración de UFC/mL y rendimientos ($Y_{X/S}$). En cuanto a P_v , peso seco y parámetros cinéticos, presentan valores similares a lo largo del cultivo. La biomasa se concentró utilizando el filtro tangencial, proceso que tomó seis días y sufrió un 99% de pérdida de viabilidad. La biomasa se conservó en heladera durante 22 días hasta su aplicación.

El porcentaje de oxígeno disuelto fue de 20,3% al final del cultivo. El consumo total de azúcares fue de 48,4 g/L, observándose un mayor consumo de azúcares en la cuarta y tercera etapa del cultivo. El consumo de nitrógeno libre fue 0,68 g/L, similar en todas las etapas de cultivo (Figura 30). La producción de biomasa promedio fue de 9,9 g/L, superior al reactor RSC anterior.

Tabla 24. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en reactor semicontinuo con medio optimizado SQP.

Reactor	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/mL*	X (g/L)	Y _{X/S} (g _X /g _S)	P _v (g/L.h)
RB1	3,05	0,073	5	119	7,90x10 ¹³	5,57	0,43	0,08
RB2	3,71	0,060	-					
RB3	3,86	0,028	-					
RB4	3,94	0,023	-					

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DO_f/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; P_v: productividad volumétrica.
*La suma de lo obtenido en cada uno de los *batch* del cultivo semicontinuo.

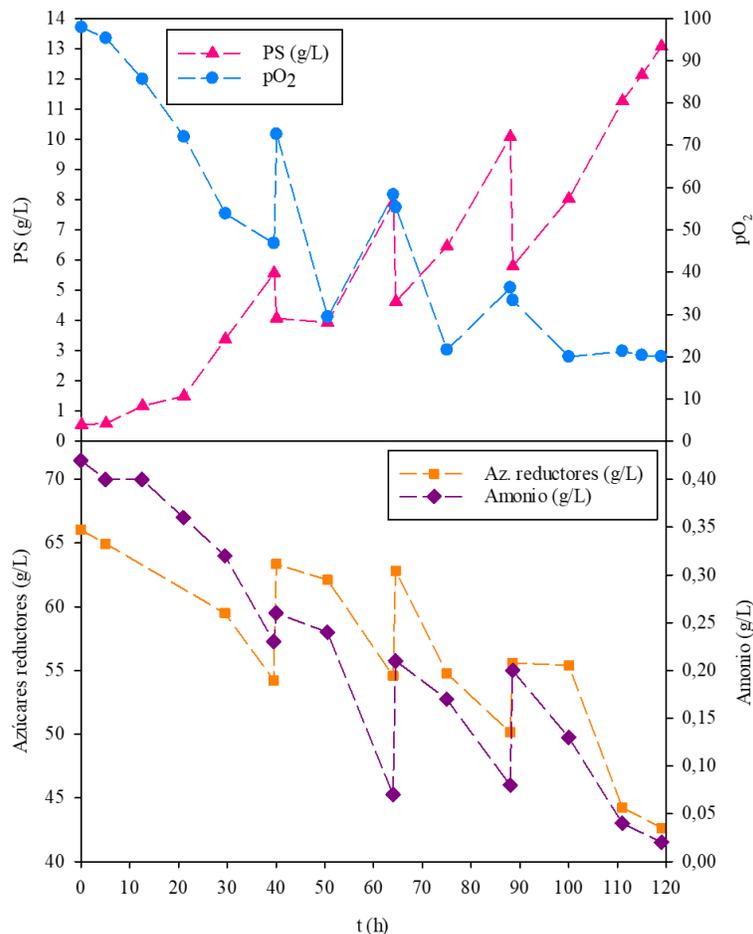


Figura 30. Producción de biomasa en reactor semicontinuo de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco en medio optimizado. pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno.

10 Escalado de la producción de biomasa de ACB a 100 L en planta piloto

10.1 Dimensiones de reactores

De acuerdo a lo establecido por Doran (2013), se midieron inicialmente las dimensiones del reactor de 15 L denominado reactor modelo (M) y del reactor de 140 L denominado reactor prototipo (P). Luego con estos datos se calcularon las relaciones geométricas entre dichas dimensiones (Tabla 25). Ambos reactores se encuentran diseñados de acuerdo a los valores de especificaciones geométricas establecidos, sin embargo, el reactor P disponible presenta similitud geométrica con el reactor M sólo en algunas relaciones: ancho de baffles/diámetro del tanque (W_{BF}/D_T), ancho agitador/diámetro agitador (W_B/D_i), diámetro agitador/diámetro tanque (D_i/D_T). Si bien no todos los valores son iguales, no existen grandes diferencias en la mayoría de las relaciones calculadas (Tabla 25).

10.2 Escalado según k_La

Se determinó el k_La mediante el método dinámico anteriormente descrito para el reactor M. De acuerdo a esta determinación, se obtuvo un valor de $25,2 \text{ h}^{-1}$ para el reactor P, esta mínima diferencia con el valor obtenido para el reactor M ($23,7 \text{ h}^{-1}$), nos permite establecer como criterio de escalado, el valor de k_La .

10.3 Producción de biomasa a escala piloto en reactor *batch* de 140 L

Se evaluó el crecimiento de la levadura a escala piloto (P) en un reactor de 140 L con un volumen final de cultivo de 100 L. Se realizó un cultivo *batch* y la biomasa producida se liofilizó con el objetivo de evaluar la capacidad antagónica de *V. victoriae* en línea de empaque comercial. Se determinaron los parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento y de producción de biomasa (Tabla 26). El consumo total de azúcares fue de 34,3 g/L y de 0,35 g/L del nitrógeno disponible, el porcentaje de oxígeno disuelto fue de 30% al final del cultivo (Figura 31). La biomasa se concentró utilizando un filtro tangencial escala piloto, este proceso tomó dos horas y la biomasa no sufrió pérdida de viabilidad.

Tabla 25. Comparación escala laboratorio (M) vs escala piloto (P).

Dimensiones		Modelo	Prototipo
Volumen	V [m ³]	0,012	0,100
Diámetro del tanque	D _T [m]	0,21	0,40
Diámetro del agitador	D _i [m]	0,07	0,20
Número de agitadores	-	3	3
Longitud del agitador	L _B [m]	0,02	0,10
Ancho del agitador	W _B [m]	0,015	0,06
Nivel del líquido	H _L [m]	0,36	0,80
Altura total	H _T [m]	0,45	1,27
Nivel del agitador	C _i [m]	0,15	0,16
Distancia entre agitadores	ΔC [m]	0,09	0,12
Diámetro del aireador	D _S [m]	0,065	0,18
Nivel del aireador	S _S [m]	0,025	0,115
Ancho de baffles	W _{BF} [m]	0,025	0,04
Altura total/diámetro del tanque	H _T /D _T [-]	2,14	3,17
Longitud agitador/diámetro agitador	L _B /D _i [-]	0,29	0,50
Diámetro agitador/diámetro tanque	D _i /D _T [-]	0,33	0,50
Ancho agitador/diámetro agitador	W _B /D _i [-]	0,21	0,30
Nivel del líquido/diámetro Tanque	H _L /D _T [-]	1,71	2
Distancia Agitadores/diámetro agitador	ΔC /D _i [-]	1,28	0,60
Nivel del agitador/diámetro tanque	C _i /D _T [-]	0,70	0,40
Ancho de Baffles/diámetro tanque	W _{BF} /D _T [-]	0,11	0,10
Área Superficial Tanque/Volumen	$\frac{\pi \cdot \left(\frac{D_T^2}{2} + D_T \cdot H_L \right)}{V} \text{ [m}^{-1}\text{]}$	25,80	12,60

Tabla 26. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en el reactor a 100 L (P) con medio optimizado SQP.

Reactor	Parámetros cinéticos					Parámetros de producción		
	A	μ _{máx} (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	t _d (h)	X (g/L)	Y _{X/S} (g _X /g _S)	P _v (g/L.h)
P	3,48	0,07	2,30	70	10	20,70	0,61	0,30

μ_{máx}: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DO_f/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; P_v: productividad volumétrica.

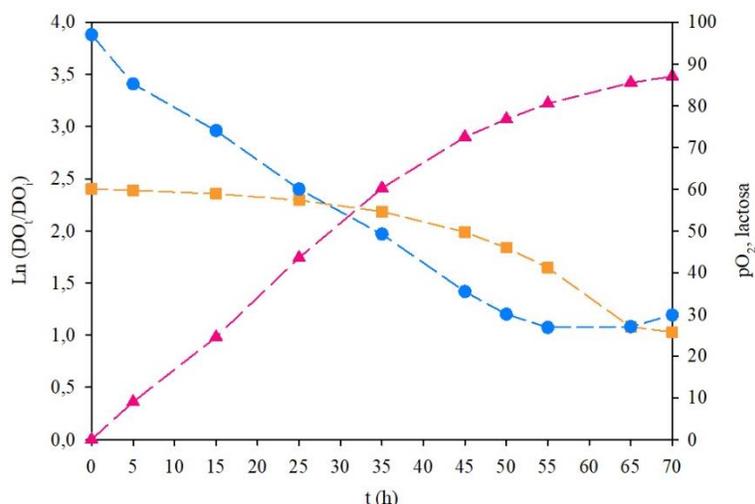


Figura 31. Producción de biomasa en reactor *bacth* de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor P a escala piloto en medio optimizado. Ln (DO_t/DO_i) (—▲—), DO_t: densidad óptica de la levadura al tiempo t, DO_i: densidad óptica inicial de la levadura; lactosa (g/L) (—■—); pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno (—●—).

10.1 Secado por liofilización

La biomasa obtenida del reactor P se sometió a un proceso de liofilización en las condiciones especificadas. Se calculó el efecto de la liofilización en la viabilidad de la levadura, observándose que esta disminuye en tres órdenes de magnitud respecto a la levadura fresca, de $1,610^{12}$ UFC/mL al tiempo cero de producción a $2,6 \times 10^9$ UFC/mL como LSA rehidratada en volumen inicial. Posteriormente se determinó el porcentaje de viabilidad de la biomasa seca luego de 330 días de almacenamiento a 20°C (Tabla 27). Resultados muestran que la biomasa disminuye su viabilidad durante el almacenamiento en un 32,4% a los 90 días.

Tabla 27. Viabilidad de *V. victoriae* preservada por liofilización como LSA luego de diferentes tiempos de almacenamiento.

Tiempo (días)	Reactor P	
	Viabilidad (%)	DS ±
0	100	9,80
60	87,20	15,80
90	67,60	15,40
180	39,70	18,40
330	35,10	11,80

DS: desviación estándar.

10.2 Secado por spray

Con el objetivo de obtener biomasa deshidratada por otro método de secado se evaluó el secado *spray*. Se evaluaron dos condiciones de secado, C1: temperatura de entrada/salida de 100°C/55°C y C2: temperatura de entrada/salida de 80°C/49°C. En los dos casos la viabilidad de las levaduras disminuyó significativamente con respecto a su valor inicial (Tabla 28). La viabilidad de la biomasa de $1,6 \times 10^{12}$ UFC/mL al tiempo cero de producción disminuye a $6,2 \times 10^5$ UFC/mL y $6,53 \times 10^5$ UFC/mL con la condición C1 y C2 respectivamente, como LSA rehidratadas en volumen inicial. La viabilidad durante el período de conservación disminuye a los 330 días hasta alcanzar un 2,9% de viabilidad en C1 y 10,7% en C2. En ambas condiciones evaluadas la viabilidad obtenida luego del secado y durante el período de conservación no es suficiente para ser aplicada en ensayos a escala comercial sobre frutas.

Tabla 28. Viabilidad de *V. victoriae* preservada por secado *spray* luego de diferentes tiempos de almacenamiento.

Tiempo (días)	C1		C2	
	Viabilidad (%)	DS \pm	Viabilidad (%)	DS \pm
0	100	5,30	100	12,90
150	13,40	5,10	30,40	3,80
330	2,90	2,30	10,70	3,50

C1: temperatura de entrada/salida de 100°C/55°C. C2: temperatura de entrada/salida de 80°C/49°C. Q: 100 mL/h.

11 Ensayos a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica

Para evaluar la eficacia como ACB de la biomasa de *V. victoriae* producida en dos configuraciones de reactor y en dos escalas (*batch* 100 L y semicontinuo), se realizó un ensayo sobre sobre peras del varietal Packham's Triumph y Beurré D'Anjou y manzanas del varietal Red Delicious. Cada bins de peras Packham's Triumph contenía 1700-2300 frutas con una presión promedio de 12,8 lb y contenido de SS de 15%, mientras que cada bins de Beurré D'Anjou contenía 1800-2300 frutas con una presión de 12,4 lb y 14% de SS. Para el caso de Red Delicious, cada bins contenía 2000-2500 frutas con una presión de 16,5 lb y 16% de SS. Se aplicaron dos tratamientos en línea de empaque, **BF**: biomasa fresca crecida en RSC a escala banco; **BLR**: biomasa liofilizada-rehidratada crecida en reactor P a 100 L (Figura 32).

Para el caso del varietal Beurré D'Anjou a los 100 días de almacenamiento, se observa un porcentaje de incidencia total de podredumbres del 2,61% en el tratamiento control y de 1,42% y 1,24% en los tratamientos **BF** y **BLR** respectivamente, estas podredumbres son causadas principalmente por *Alternaria-Cladosporium* spp. (Figura 32, A). En cuanto a los porcentajes de control, el tratamiento **BF** logró controlar el 45,5% del total de las enfermedades fúngicas, correspondiendo el 81,2% a *Alternaria-Cladosporium* spp. y el 42,7% a *P. expansum* y *B. cinerea*. El tratamiento **BLR** controló el 52,5% el total de las enfermedades fúngicas, lo que corresponde a 68,9% a *Alternaria-Cladosporium* spp. y 80,6% a *P. expansum*. Luego de 150 días de almacenamiento los porcentajes de incidencia total de podredumbres ascienden a 4,45% en el tratamiento control y de 2,55% y 2,27% en los tratamientos **BF** y **BLR** respectivamente (Figura 32, B). El tratamiento **BF** logró controlar el 42,7% del total de las enfermedades, correspondiendo el 40,4% a *P. expansum*, 23,5% a *B. cinerea* y 46% a *Alternaria-Cladosporium* spp. El tratamiento **BLR** controló el 49% el total de las enfermedades, lo que corresponde a 74% a *P. expansum* y 5,9% a *Alternaria-Cladosporium* spp.

Para el varietal Packham's Triumph la incidencia de las enfermedades fúngicas se observó a los 150 días de almacenamiento (Figura 32, C). La incidencia natural total en el tratamiento control fue del 6,31% mientras que para el tratamiento **BLR** fue de 5,93%, la incidencia de *B. cinerea* se mantuvo igual que el tratamiento control, por lo tanto, no logró controlar a *P. expansum* y controló la enfermedad de *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 32,7%.

En Red Delicious los porcentajes de incidencia de enfermedades fúngicas luego de 180 días de conservación fueron mucho más bajos en comparación con los varietales de pera (Figura 32, D). Se alcanzó una incidencia total de podredumbres en el tratamiento control del 0,87%. El tratamiento **BF** logró controlar a *P. expansum* en un 67,9%, a *B. cinerea* en un 57,2% y a *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 24%. Por otro lado, el tratamiento **BLR** controló la enfermedad de *P. expansum* en un 62,5%, la incidencia de *B. cinerea* fue la misma que en el tratamiento control y logró controlar a *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 11,1%.

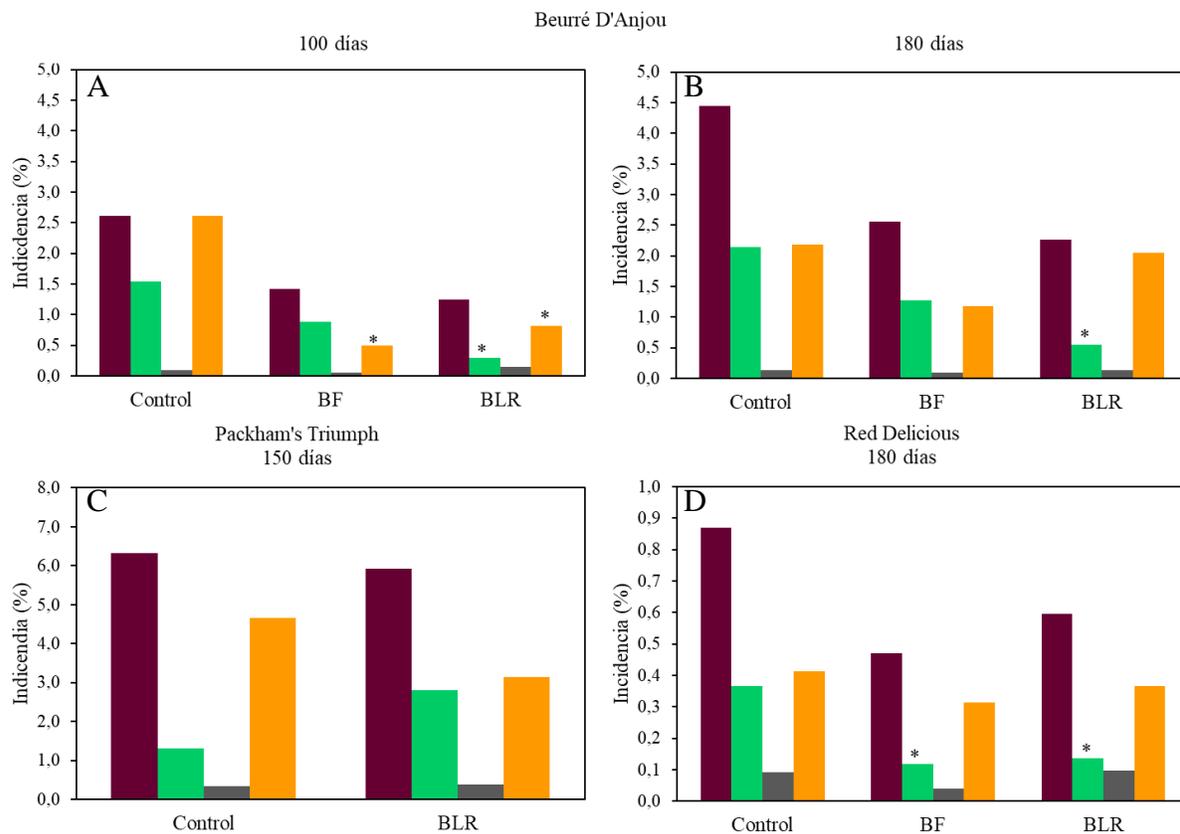


Figura 32. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total de podredumbres tras 100 (A), 150 (B y C) y 180 (D) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Beurré D'Anjou (A y B), Packham's Triumph (C) y Red Delicious (D). Tratamientos: biomasa fresca crecida en el RSC (**BF**); biomasa liofilizada-rehidratada crecida en RB 100 L (**BLR**). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

11.1 Aplicación y colonización de las levaduras en la superficie de la fruta almacenada en frío

Las cantidades iniciales de levaduras vivas aplicadas en los tratamientos **BF** y **BLR** para los tres varietales no se redujeron de manera significativa cuando se comparan los valores obtenidos antes y después de que la levadura pase por el sistema de aplicación (Tabla 29).

Con el objetivo de evaluar si la levadura aplicada en el ensayo en línea tiene la capacidad de crecer sobre la superficie de la fruta durante el período de almacenamiento, se evaluó la cantidad de células vivas a lo largo del mismo (Figura 33). Al inicio del ensayo, para el tratamiento **BF** la superficie de Beurré D'Anjou contenía una media de

1,53x10⁵UFC/fruta (1,11x10³ UFC/cm²), mientras que la superficie de Red Delicious contenía 5,13x10⁴ UFC/fruta (3,87x10² UFC/cm²). En el tratamiento **BLR**, la superficie de Packham's Triumph contenía una media de 1,48x10⁵ UFC/fruto (1,05x10³ UFC/cm²), sobre el varietal Beurré D'Anjou 7,35x10⁴ UFC/fruto (5,76x10² UFC/cm²) y sobre el varietal de manzana Red Delicious 6,63x10⁴ UFC/fruto (5,77x10² UFC/cm²).

La levadura aplicada en el tratamiento **BF** sobre el varietal Beurré D'Anjou presenta un crecimiento exponencial durante los primeros 60 días de conservación, seguido de una fase estacionaria hasta los 150 días de conservación, aumentando su concentración en 0,66 unidades logarítmicas (1,24x10³ UFC/cm²). El mismo tratamiento BF sobre Red Delicious aumentó la concentración en 0,33 unidades logarítmicas.

Por otro lado, la levadura aplicada en el tratamiento **BLR** sobre el varietal Beurré D'Anjou presentó una fase de latencia los primeros 30 días y luego una fase exponencial hasta los 60 días de conservación, alcanzando la fase estacionaria luego de los 100 días, aumentando su concentración en 2 unidades logarítmicas (2,43x10³ UFC/cm²). El mismo tratamiento BLR sobre el varietal Packham's Triumph presentó un crecimiento exponencial los primeros 60 días de conservación y luego una fase estacionaria hasta el final del período de almacenamiento, aumentando su concentración en 0,92 unidades logarítmicas. Sobre el varietal Red Delicious la levadura aumentó su concentración en 0,18 unidades logarítmicas.

Tabla 29. Efecto del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de las levaduras y concentración de *V. victoriae*.

Tratamiento	BF		BLR		
	Beurré D'Anjou	Red Delicious	Packham's Triump	Beurré D'Anjou	Red Delicious
Tanque (UFC/mL)	3,67x10 ⁶ a	3,67x10 ⁶ a	3,50x10 ⁷ a	3,50x10 ⁷ a	3,20x10 ⁷ a
Pico (UFC/mL)	2,80x10 ⁶ a	2,92x10 ⁶ a	2,37x10 ⁷ a	2,37x10 ⁷ a	2,70x10 ⁷ a

Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (p < 0,05).

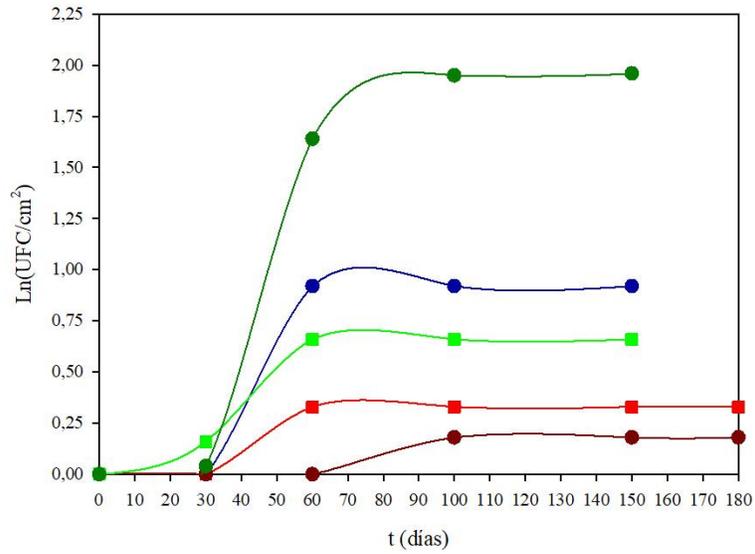


Figura 33. Crecimiento sobre la superficie de la fruta ($\text{Ln}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$) durante el período de conservación en cámara frigorífica. Packham's Triumph: **BLR** (●); Beurré D'Anjou: **BF** (■), **BLR** (●); Red Delicious: **BF** (■), **BLR** (●).

Empleo de un medio de cultivo basado en mosto de manzana para el desarrollo del agente de control biológico *V. victoriae*

1 Caracterización del mosto de manzana (MM)

El MM es un líquido color rojo-cobrizo homogéneo que se obtiene a partir de la molienda y prensado de las manzanas (Figura 34). La composición varía en función de la variedad de manzana utilizada y del tipo de procesamiento aplicado para la extracción del zumo, especialmente en lo que se refiere al número de veces que se prensan los frutos. Con el objetivo de conocer la composición del mosto de manzana, se realizaron distintas determinaciones: azúcares, amonio, proteínas y FAN (Tabla 30). Resultados muestran que el MM posee una adecuada concentración de azúcares reductores para el crecimiento de las levaduras, los principales azúcares son la fructosa (12,6% p/v) y la glucosa (3,2% p/v), mientras que la sacarosa es el principal disacárido (1,48% p/v).

Los minerales, también llamados nutrientes inorgánicos, se encuentran en el jugo de manzana. Los cationes y aniones más importantes son el potasio (680 ppm), el calcio (140 ppm) y el fósforo (130 ppm). Otros elementos como el sodio, el cobre, el magnesio, el manganeso, el zinc y el hierro también están presentes en concentraciones más bajas. En cuanto a la concentración de nitrógeno, presenta una baja concentración para el desarrollo de las levaduras, por lo tanto, sería necesario adicionar al medio de cultivo una fuente de nitrógeno.

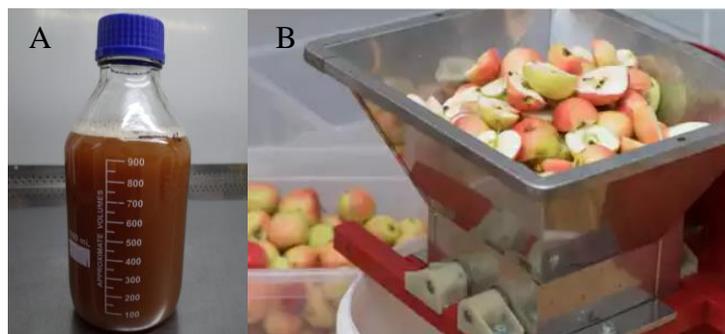


Figura 34. (A) Mosto de manzana estéril (MM). (B) Molienda de manzanas.

Tabla 30. Caracterización fisicoquímica del mosto de manzana.

Compuesto	Concentración
Azúcares reductores totales (g/L)	143.23 ± 10.97
Sacarosa (g/L)	14.78 ± 6.73
Glucosa (g/L)	31.83 ± 5.68
Fructosa (g/L)	126.13 ± 23.90
FAN (ppm)	42.84 ± 4.21
NH ₄ ⁺ (ppm)	14 ± 1
Proteínas totales (g/L)	6.51 ± 1.76
Potasio (ppm)	680
Fósforo (ppm)	130
Sodio (ppm)	28
Magnesio (ppm)	31
Calcio (ppm)	140
Hierro (ppm)	3.3
Zinc (ppm)	2.9
Cobre (ppm)	1.7
Manganeso (ppm)	0.4
pH	5.8 ± 0.2

FAN: nitrógeno fácilmente asimilable.

1.1 Evaluación de MM como medio de cultivo

Se realizaron diferentes ensayos para evaluar el crecimiento de *V. victoriae* con diferentes concentraciones de fuente de carbono, de nitrógeno y micronutrientes, a partir de datos reportados en bibliografía sobre el crecimiento de las levaduras en general y en trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio (Gramisci, 2019).

Para establecer el mejor medio de cultivo para esta especie, se evaluaron siete factores del medio del medio cultivo y se determinaron los parámetros de crecimiento y experimentales obtenidos en cada caso (Tabla 31). Las condiciones 3 y 7 fueron las que presentaron los mejores resultados en cuanto a producción de biomasa, rendimiento y productividad. Sin embargo, se seleccionó la condición 3 (MM 50% v/v, urea 1,4 g/L y biotina 2,5 µg/L) ya que el medio de cultivo resultante es mucho más económico para escalar nivel de reactor.

Tabla 31. Parámetros de crecimiento obtenidos para *V. victoriae* variando siete factores del medio del medio cultivo.

C.E	Factores							Parámetros de producción de biomasa					
	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃ (g/L)	X ₄ (g/L)	X ₅ (g/L)	X ₆ (g/L)	X ₇ (μg/L)	A	μ _{máx}	Lag (h)	t (h)	X (g/L)	P _v (g/L.h)
1	25	0,8	0,75	1,5	6	1,8	1	0,18	0,04	87	139	0,32	0,002
2	75	0,8	0,75	1,5	6	1	4	1,07	0,01	37	161	0,49	0,003
3	50	0,0	0	0	0	1,4	2,5	4,64	0,09	37	305	7,33	0,024
4	0	0,6	0,5	1	4	1,4	2,5	0,74	0,14	86	137	0,06	0,000
5	93	0,6	0,5	1	4	1,4	2,5	2,91	0,02	156	332	5,14	0,015
6	50	1,1	1	2	8	1,4	2,5	0,08	0,004	35	161	0,31	0,002
7	75	0,3	0,25	0,5	2	1,8	1	3,54	0,03	29	185	7,48	0,040

C.E: corrida experimental, Mosto de manzana (X₁), MnSO₄ (X₂), FeSO₄ (X₃), ZnSO₄ (X₄), KH₂PO₄ (X₅), urea (X₆), biotina (X₇). A: Ln(DO_f/DO_i), DO_f: densidad óptica final, DO_i: densidad óptica; inicial X: concentración final de biomasa; P_v: productividad volumétrica.

2 Producción de biomasa en reactor *batch* de 15 L

Se evaluó el crecimiento de la levadura a mayor escala en la condición de cultivo seleccionada (MM 50% v/v, urea 1,4 g/L, biotina 2,5 μg/L) en un reactor de 15 L con un volumen final de cultivo de 12 L. Se realizaron dos cultivos *batch* denominados reactor *batch* 1 y 2 (RB1, RB2) (Figura 35, Tabla 32), con el objetivo de obtener la biomasa necesaria para evaluar la aplicación de *V. victoriae* en línea de empaque comercial. La biomasa se dejó decantar en heladera durante cinco días y luego se concentró por centrifugación, este proceso generó una pérdida de viabilidad del 18,2% para RB1, mientras que no se observó pérdida de viabilidad en RB2.

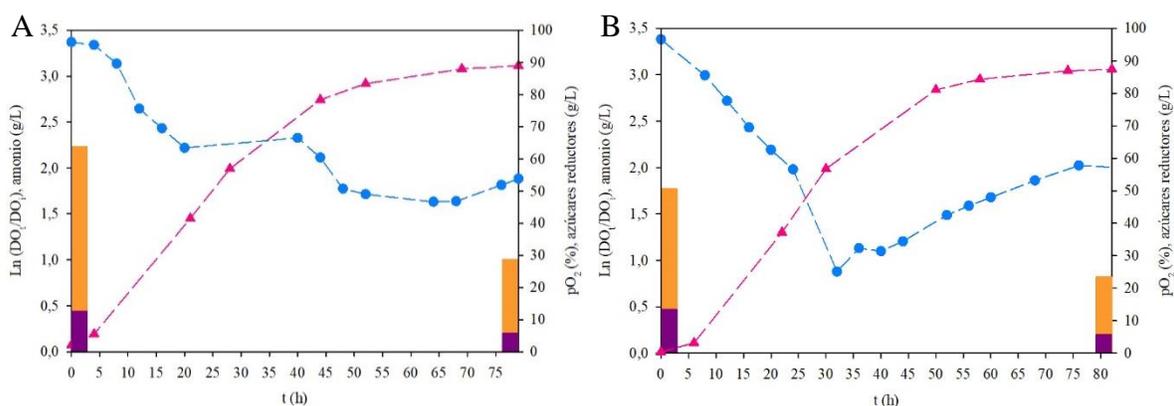


Figura 35. Curvas de crecimiento de los dos reactores de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco (15 L). (A) RB1. (B) RB2. (modeladas por el modelo de Gompertz modificado). Amonio (■); lactosa (■); A (▲): Ln(DO_f/DO_i), DO_f: densidad óptica final de la levadura, DO_i: densidad óptica inicial de la levadura; pO₂ (●): porcentaje de presión parcial de oxígeno.

Tabla 32. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *V. victoriae* y parámetros de producción de biomasa en reactor

Reactor	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción de biomasa			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/mL	X (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Pv (g/L.h)
RB1	3,14	0,053	4,36	79	1,1x10 ⁹	12,98	0,37	0,16
RB2	3,07	0,055	8,38	82	7x10 ⁸	13,32	0,49	0,16

$\mu_{\text{máx}}$: 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; P_v : productividad volumétrica. Las curvas fueron modeladas por el modelo de Gompertz.

2.1 Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de *V. victoriae* crecida en mosto de manzana, se realizaron ensayos sobre el varietal Packham's Triumph, en un empaque regional con manejo orgánico. Debido a la pandemia de COVID en 2020, los ensayos se retrasaron dos meses, durante este periodo la biomasa recogida en RB1 y en RB2 se unificó y se refrigeró a 4°C. Antes de realizar el ensayo en mayo del 2020, se evaluó la viabilidad de las levaduras (UFC) en el laboratorio para hacer la dilución correspondiente para el tratamiento que se aplicaría. Se observó que en los dos meses de conservación a 4°C las UFC cayeron en 2 órdenes de magnitud (7,7x10⁹ UFC/mL a 1,45x10⁷ UFC/mL). El almacenamiento prolongado de la biomasa concentrada a 4°C podría explicar la pérdida de viabilidad.

En este ensayo, se realizó un único tratamiento, **BF**: biomasa fresca crecida en reactor batch con el agregado de CaCl₂ 2% p/v, para calcular el porcentaje de control se comparó con un tratamiento **Control** (agua de red + CaCl₂ 2% p/v). Se emplearon bins con 1300-1600 unidades de peras, que desde la cosecha (febrero 2020) estaban conservadas en las cámaras frías con una presión de 13,5 lb y 13% de SS. Los tratamientos se conservaron en cámaras frías durante cinco meses respondiendo al manejo del empaque.

Después de 90 días de almacenamiento en cámara frigorífica la fruta tratada presentó una incidencia total del 1,23% de podredumbres en el tratamiento control (agua). El tratamiento con el ACB redujo la incidencia total en 89%, controló el 100% de incidencia causada por *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium* spp., y el 86% de incidencia causada por *P. expansum* (Figura 36, A). Tras 150 días de almacenamiento, la incidencia total de las enfermedades fúngicas alcanzó el 4,06%. El tratamiento redujo las podredumbres causadas

por *P. expansum*, *B. cinerea*, y *Cladosporium* spp., alcanzando el 88%, 6% y 30% del control respectivamente (Figura 36, B).

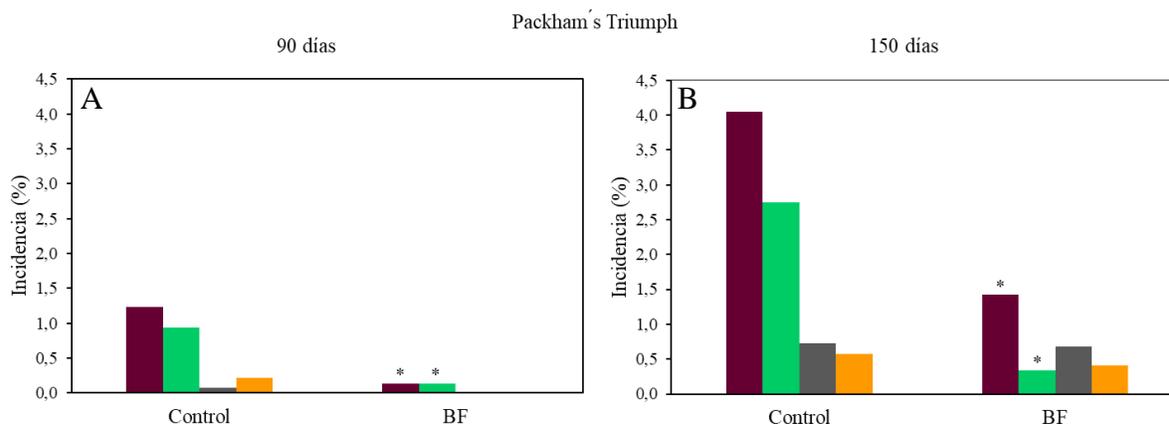


Figura 36. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total tras 90 (A) y 150 (B) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica. Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento **BF** (biomasa fresca) y el **Control** (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

2.2 Colonización por levaduras de la superficie de la fruta almacenada en frío

El día del ensayo a nivel comercial se realizó también el recuento de UFC en el agua de tanque ($3,37 \times 10^6$ UFC/mL) donde se preparó el tratamiento y en el agua pulverizada ($1,15 \times 10^6$ UFC/mL) mediante el sistema de aplicación de tubo de PVC perforado. La cantidad inicial de levaduras aplicadas en el tratamiento en la línea de empaque se mantuvo constante con respecto al número inicial en el agua de tanque (Tabla 33). No hubo una reducción de la viabilidad cuando la levadura pasó a través del sistema de aplicación. Luego de la aplicación, se determinó el número de levaduras en la superficie de la pera, la cual tenía en promedio $1,9 \times 10^4$ UFC/fruta ($1,3 \times 10^2$ UFC/cm²). Durante los 150 días de conservación la levadura creció de manera exponencial aumentando en 3,48 unidades logarítmicas, alcanzando $4,22 \times 10^3$ UFC/cm² (Figura 37).

Tabla 33. Concentración de *V. victoriae* en el tanque y a la salida del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial.

Tratamiento	Packham's Triumph	
	Tanque (UFC/mL)	Salida (UFC/mL)
MM	$3,37 \times 10^6$ a	$1,15 \times 10^6$ a

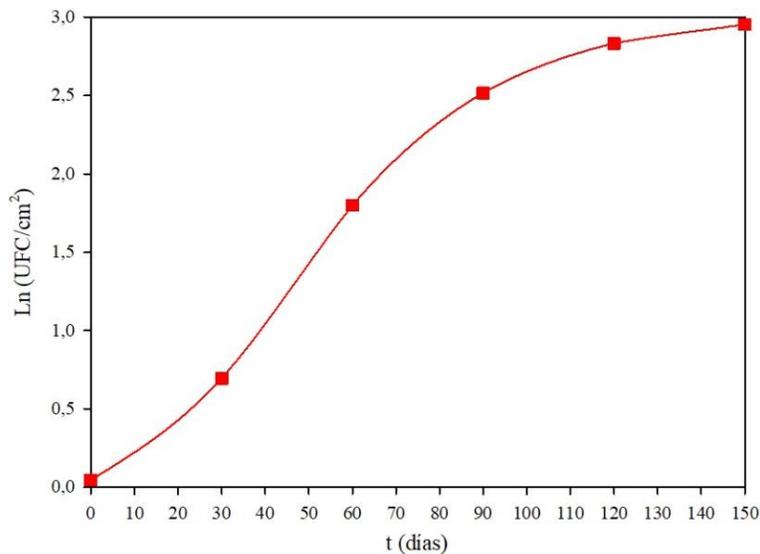


Figura 37. Crecimiento sobre la superficie de la fruta ($\text{Ln (UFC/cm}^2\text{)}$) durante el período de conservación en cámara frigorífica. Varietal Packham's Triumph.

3 Optimización de la producción de biomasa de *V. victoriae*

3.1 Primera optimización del medio de cultivo

Teniendo en cuenta los valores de producción obtenidos en la primera evaluación del MM como medio de cultivo, se llevó a cabo una optimización mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño central compuesto (DCC) con cuatro factores, MM (X_1), y KH_2PO_4 (X_2), urea (X_3) y biotina (X_4). Los resultados obtenidos sugieren que la adición de KH_2PO_4 y un aumento en la concentración de urea podrían aumentar la producción de biomasa. Cada factor se estudió en cinco niveles diferentes ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) y sus valores se resumen en la Tabla 34. Se realizaron 24 ensayos con 2 puntos centrales y los puntos estrella ($\pm\alpha$) se situaron a ± 2 del centro para tener en cuenta la rotabilidad, lo que permite realizar predicciones con la misma precisión en todas las direcciones de la superficie ajustada (Montgomery, 2017).

De acuerdo a los gráficos de MSR, los resultados del análisis del DCC muestran que el punto óptimo donde la producción de biomasa alcanzaría un máximo se encuentra fuera de la región experimental (Figura 38). Por lo tanto, concentraciones de MM mayores al 30% v/v y de KH_2PO_4 mayores a 7 g/L permitirían obtener mayores concentraciones de biomasa (Figura 38, A). En el caso de la urea y la biotina, se observa que independientemente de la concentración que sea evaluada, se obtendrá mayor

concentración de biomasa cuando se combinen con concentraciones de MM mayores a 30% v/v (Figura 38, B y C). Para encontrar el punto óptimo es necesario desplazarse de la región actual a la mejor dirección y realizar otro diseño experimental que abarque a los puntos en cuestión y permita estudiar los efectos de curvatura pura.

Tabla 34. Diseño central compuesto (DCC) y resultados para la primera optimización de producción de biomasa (X_1 : MM; X_2 : KH_2PO_4 ; X_3 : urea, X_4 : biotina).

Corrida	Valores codificados				Valores reales (g/L)				Biomasa (g/L)		t*(h)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1	X_2	X_3	X_4	Observada	Predicha	
1	-1	-1	-1	-1	15	1,5	1,8	5,0	4,87	5,08	122
2	-1	-1	-1	1	15	1,5	1,8	6,0	5,13	5,14	122
3	-1	-1	1	-1	15	1,5	2,2	5,0	4,76	5,19	122
4	-1	-1	1	1	15	1,5	2,2	6,0	5,25	5,15	122
5	-1	1	-1	-1	15	4,5	1,8	5,0	4,95	5,09	122
6	-1	1	-1	1	15	4,5	1,8	6,0	5,04	5,10	122
7	-1	1	1	-1	15	4,5	2,2	5,0	6,01	5,75	122
8	-1	1	1	1	15	4,5	2,2	6,0	5,39	5,65	122
9	1	-1	-1	-1	25	1,5	1,8	5,0	7,36	7,15	122
10	1	-1	-1	1	25	1,5	1,8	6,0	6,84	7,44	122
11	1	-1	1	-1	25	1,5	2,2	5,0	6,97	7,11	122
12	1	-1	1	1	25	1,5	2,2	6,0	7,44	7,30	146
13	1	1	-1	-1	25	4,5	1,8	5,0	7,87	8,17	146
14	1	1	-1	1	25	4,5	1,8	6,0	8,8	8,41	166
15	1	1	1	-1	25	4,5	2,2	5,0	8,68	8,68	146
16	1	1	1	1	25	4,5	2,2	6,0	8,71	8,81	166
17	-2	0	1	0	10	3,0	2,0	5,5	4,55	4,40	122
18	2	0	1	0	30	3,0	2,0	5,5	9,12	9,63	166
19	0	-2	1	0	20	0,0	2,0	5,5	5,05	5,06	122
20	0	2	1	0	20	6,0	2,0	5,5	6,18	6,59	122
21	0	0	-2	0	20	3,0	1,6	5,5	5,96	5,96	146
22	0	0	2	0	20	3,0	2,4	5,5	6,16	6,48	122
23	0	0	0	-2	20	3,0	2,0	4,5	7,05	7,15	146
24	0	0	0	2	20	3,0	2,0	6,5	6,97	7,34	146
25 (C)	0	0	0	0	20	3,0	2,0	5,5	4,08	4,63	122
26 (C)	0	0	0	0	20	3,0	2,0	5,5	5,06	4,63	122

*Tiempo al comienzo de la fase estacionaria.

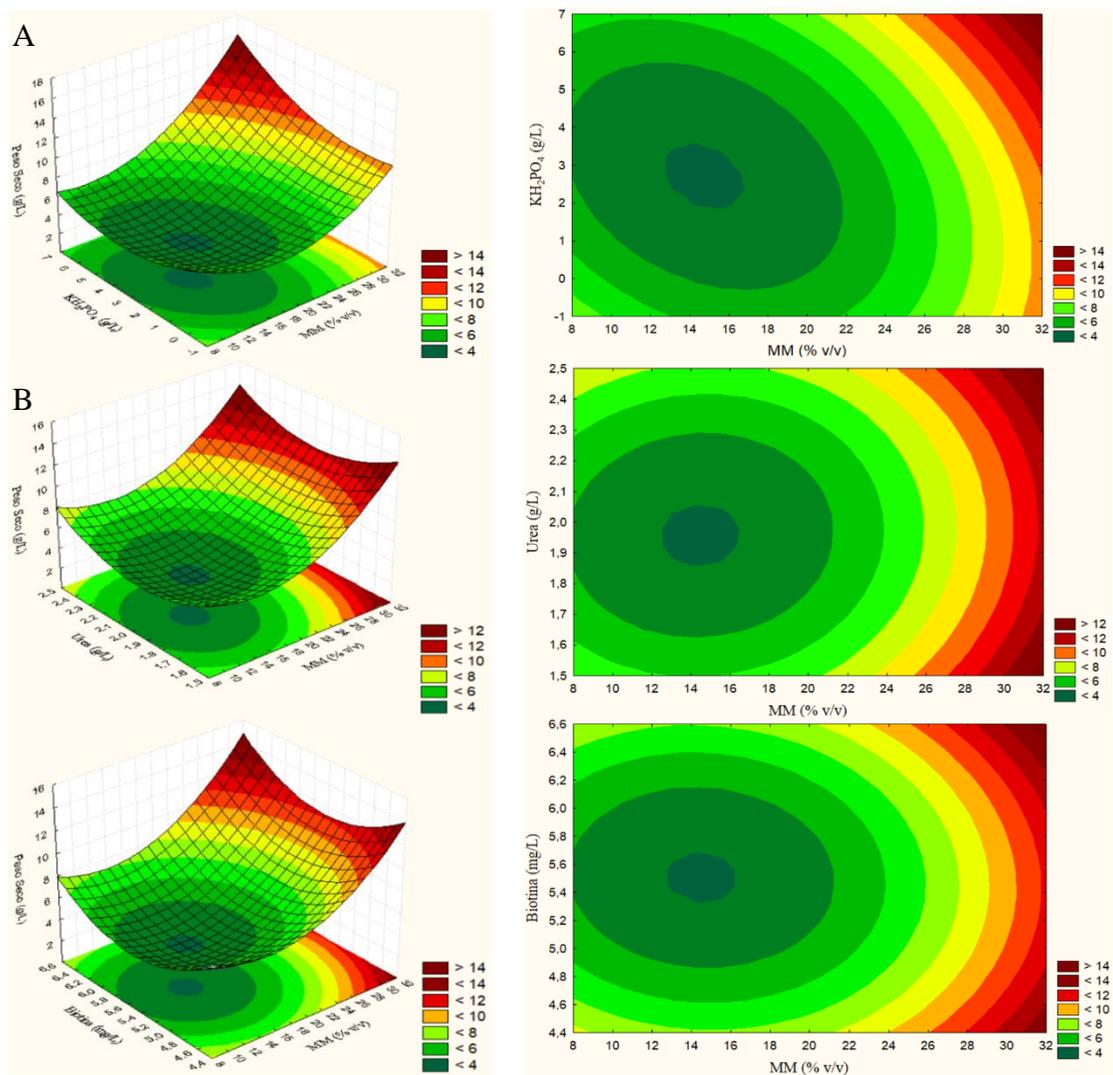


Figura 38. Superficies de respuesta y gráficos de contornos obtenidos en la primera optimización para la variable respuesta Peso Seco.

3.2 Segunda optimización

A fin de continuar con la definición del medio de cultivo a formular, se amplió el análisis para encontrar los niveles óptimos de los factores que maximicen la producción de biomasa de *V. victoriae*. Se realizó un DCC con dos factores, MM (X_1), y KH_2PO_4 (X_2), aumentando las concentraciones utilizadas en la primera optimización. La biotina no fue tenida en cuenta ya que resulta un insumo costoso y por los resultados previamente obtenidos se observa que la cantidad evaluada no influye significativamente en el aumento de la concentración de biomasa. Por otro lado, la concentración de urea se mantuvo fija en todos los ensayos en 2 g/L, considerando que es un insumo económico y que el aporte de una fuente nitrogenada es necesario para que las levaduras puedan alcanzar altos niveles poblacionales.

En el diseño cada factor se ensayó en cinco niveles diferentes ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) y sus valores se resumen en la Tabla 35. Se realizaron ocho ensayos con cuatro puntos centrales y los puntos estrella ($\pm\alpha$) se situaron a $\pm 1,41$ del centro para tener en cuenta la rotabilidad.

Tabla 35. Diseño central compuesto (DCC) y resultados para la segunda optimización de producción de biomasa (X_1 : MM; X_2 : KH_2PO_4).

Corrida	Valores codificados		Valores reales (g/L)		Biomasa (g/L)		t*(h)
	X_1	X_2	X_1	X_2	Observada	Predicha	
1	-1	-1	35,0	5,0	7,94	8,05	118
2	-1	1	35,0	9,0	8,80	10,33	118
3	1	-1	65,0	5,0	7,89	8,31	118
4	1	1	65,0	9,0	5,87	7,71	98
5	-1,41	0	28,8	7,0	7,82	7,06	118
6	1,41	0	71,2	7,0	6,58	5,39	98
7	0	-1,41	50,0	4,2	10,34	10,37	161
8	0	1,41	50,0	9,8	13,54	11,56	161
9 (C)	0	0	50,0	7,0	10,48	11,65	161
10 (C)	0	0	50,0	7,0	12,53	11,65	161
11 (C)	0	0	50,0	7,0	10,57	11,65	161
12 (C)	0	0	50,0	7,0	13,03	11,65	140

*Tiempo al comienzo de la fase estacionaria.

Los resultados del DCC muestran sólo un efecto significativo (cuadrático) en la variable mosto de manzana. Se obtuvo un coeficiente de determinación R^2 de 76%, lo que significa que 76% de la respuesta del modelo puede explicarse por el parámetro Peso Seco. A través del análisis de los gráficos de superficie de respuesta y de contornos elaborados por el programa (Figura 39), se puede observar que existe un máximo absoluto en el dominio experimental evaluado. La producción de biomasa es mayor cuando se emplea una concentración entre 40-55% v/v de mosto de manzana y 5,5-11 g/L de KH_2PO_4 . Del análisis de los valores observados y predichos (Tabla 35), se puede observar que concentraciones altas de cualquiera de los dos factores no logran alcanzar la mayor producción de biomasa (corridas 4 y 6), lo mismo ocurre en el caso contrario, cuando las concentraciones de ambos factores son las más bajas (corrida 1). Con el fin de seleccionar una condición para realizar la validación del medio de cultivo y llevar a cabo la producción de biomasa a mayor escala, se determinó que la condición que maximiza la producción de biomasa corresponde a: MM, 44% v/v; KH_2PO_4 , 7,3 g/L y urea, 2 g/L.

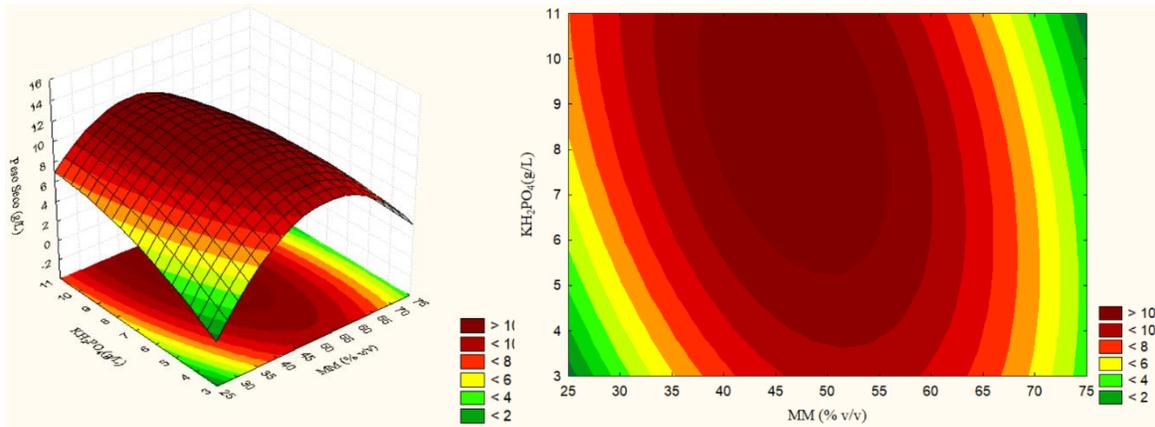


Figura 39. Superficie de respuesta y gráfico de contornos obtenidos en la segunda optimización para las variables respuesta Peso Seco.

3.2.1 Validación del medio de cultivo

Para la validación del modelo, se llevaron a cabo una nueva serie de experimentos con el medio optimizado. El tiempo de recolección de biomasa fue de 77 h en Erlenmeyer de 100 mL alcanzando una producción de biomasa de $9,92 \text{ g/L} \pm 1,48$ y de 78 h en Erlenmeyer de 1000 mL con una producción de biomasa de $9,87 \text{ g/L} \pm 0,37$. Para el biorreactor de 12 L, el tiempo de cultivo fue de 57-59 h con una producción de biomasa de $10,6 \text{ g/L} \pm 0,38$. Se calcularon los índices de validación: factor de precisión (A_f) y factor de sesgo (B_f). El valor obtenido fue el mismo en ambos casos, de 1,12 y si bien los valores obtenidos son muy cercanos a 1, estos valores indican una discrepancia del 12% entre los valores predichos y observados. El valor del factor A_f muestra una ligera tendencia en el modelo a predecir más producción de biomasa que la cantidad realmente obtenida. El valor del factor B_f indica que el modelo predice una producción de biomasa mayor a la obtenida en estos experimentos.

4 Liofilización con crioprotectores

La liofilización asegura la estabilidad de las levaduras durante el almacenamiento, pero la viabilidad de las mismas se ve afectada por el proceso de congelación, incluso utilizando los protectores de secado adecuados. En este ensayo las levaduras crecidas en el medio de cultivo optimizado fueron liofilizadas con ADE y rehidratadas con ADE durante 1 hora. Antes de la liofilización la suspensión de levaduras frescas tenía $6,8 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$. Luego de la liofilización, en la biomasa rehidratada se conservaron $3,9 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^9$

UFC/mL, lo que representa un 57,7% de viabilidad con respecto a la concentración antes del proceso de secado. Con el objetivo de mejorar la viabilidad de *V. victoriae* liofilizada se evaluó el efecto de diferentes crioprotectores (sorbitol, glicerol y GMS) y agentes protectores (SQP y LDP) mediante UFC/mL a lo largo del tiempo (Tabla 36 y 37). Asimismo, se evaluó el efecto del congelado de las levaduras a -20 y -80°C antes de la liofilización. La biomasa congelada a -80°C logró mantener una viabilidad mayor durante el transcurso del tiempo de conservación, ya sea utilizando SQP o LDP (30% p/v) como agente protector, en comparación con la biomasa congelada a -20°C (Tabla 36 y 37). Los mejores resultados de viabilidad (79,9%) luego de 90 días de almacenamiento se obtuvieron utilizando GMS 1% p/v como crioprotector y SQP 30% p/v como protectorio (Tabla 36). Por otro lado, a mayor cantidad de días de conservación, hasta 250 días, la mejor combinación para preservar la viabilidad fue GMS y LDP, logrando conservar el 30,6% de viabilidad de las levaduras (Tabla 37).

Tabla 36. Viabilidad (%) de *V. victoriae* liofilizada utilizando SQP como protectivo, previamente congelada a -20 y -80°C.

SQP 30% p/v												
GMS 1% p/v					Sorbitol 1% p/v				Glicerol 1% p/v			
Tiempo (días)	-20°C		-80°C		-20°C		-80°C		-20°C		-80°C	
	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)
0	100a	13.8	100a	6.4	100a	16.9	100a	4.2	100a	8.0	100a	12.6
45	46.2a	9.2	78.8b	7.8	60.3a	22.5	57.1a	9.7	61.2a	19.7	95.1b	14.0
90	37.7a	13.1	79.9b	6.8	59.9a	6.8	63.6a	3.6	12.7a	0.7	64.3b	2.4
135	12.8a	0.0	56.2b	13.5	26.1a	13.4	34.5a	12.5	7.7a	3.8	33.6b	8.0
210	11.1a	1.3	16.6b	4.0	10.7a	5.1	14.4a	8.0	5.7a	1.1	2.8b	1.5
255	6.5a	0.7	12.1b	4.2	5.2a	1.2	8.8a	1.7	3.8a	0.9	3.0a	0.7

SQP: suero de queso en polvo. GSM: glutamato monosódico. DS: desviación estándar. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes para el mismo crioprotector a -20°C y -80°C según las pruebas de Tukey (p<0,05).

Tabla 37. Viabilidad (%) de *V. victoriae* liofilizada utilizando LDP como protectivo, previamente congelada a -20 y -80°C.

LDP 30% p/v												
GMS 1% p/v					Sorbitol 1% p/v				Glicerol 1% p/v			
Tiempo (días)	-20°C		-80°C		-20°C		-80°C		-20°C		-80°C	
	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)	Viabilidad (%)	DS (±)
0	100a	13.2	100a	1.3	100a	12.8	100a	2.2	100a	15.0	100a	5.9
45	61.4a	8.4	72.5a	0.0	43.9a	15.9	84.4b	0.0	59.0a	15.9	70.9a	3.9
90	32.9a	9.3	61.1b	7.7	44.3a	35.3	65.2a	19.3	52.6a	8.5	67.2b	10.2
135	21.2a	11.6	34.2a	5.3	37.2a	3.9	41.8a	5.8	19.3a	5.0	38.4b	7.9
210	24.2a	15.2	44.7b	17.1	37.9a	17.5	43.7a	13.7	2.0a	1.9	14.2b	3.7
255	16.8a	7.3	30.6b	6.4	13.6a	1.3	8.3b	1.1	0.1a	0.0	2.3b	0.7

LDP: leche descremada en polvo. GSM: glutamato monosódico. DS: desviación estándar. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes para el mismo crioprotector a -20°C y -80°C según las pruebas de Tukey (p<0,05).

5 Determinación de k_{La}

La determinación del k_{La} se realizó por el método dinámico (Figura 40). En el primer panel se registra de manera gráfica y tabulada el proceso de corte de suministro de oxígeno y de re oxigenación (Figura 40, A). Durante la etapa de suspensión de la aireación, es posible determinar la tasa volumétrica de consumo de oxígeno r_O , ya que el descenso en la concentración de oxígeno disuelto es lineal con respecto al tiempo, el valor de k_{La} es cero y por lo tanto, la Ec. 5 queda como $\frac{dC_{AL}}{dt} = -r_O$ (Figura 40, B). De esta manera se define como r_O a la pendiente de la recta durante esta etapa, con un valor de 0,018 mg O₂/L.seg.

Durante la etapa de re-oxigenación, los datos se ajustan a la mejor función y se obtiene una ecuación polinómica de tercer grado, la cual es derivada analíticamente para obtener $\frac{dC_{AL}}{dt}$ (Figura 40, C). Finalmente la Ec. 5 es reordenada obteniendo otra expresión, $C_{AL} = -\left(\frac{1}{k_{La}}\right)\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + r_O\right) + C_{AL}^*$. Graficando C_{AL} vs. $\left(\frac{dC_{AL}}{dt} + r_O\right)$ se obtiene un valor de k_{La} 30,72 h⁻¹ de la pendiente y un valor de C_{AL}^* de 11,01 mg O₂/L de la ordenada al origen (Figura 40, D).

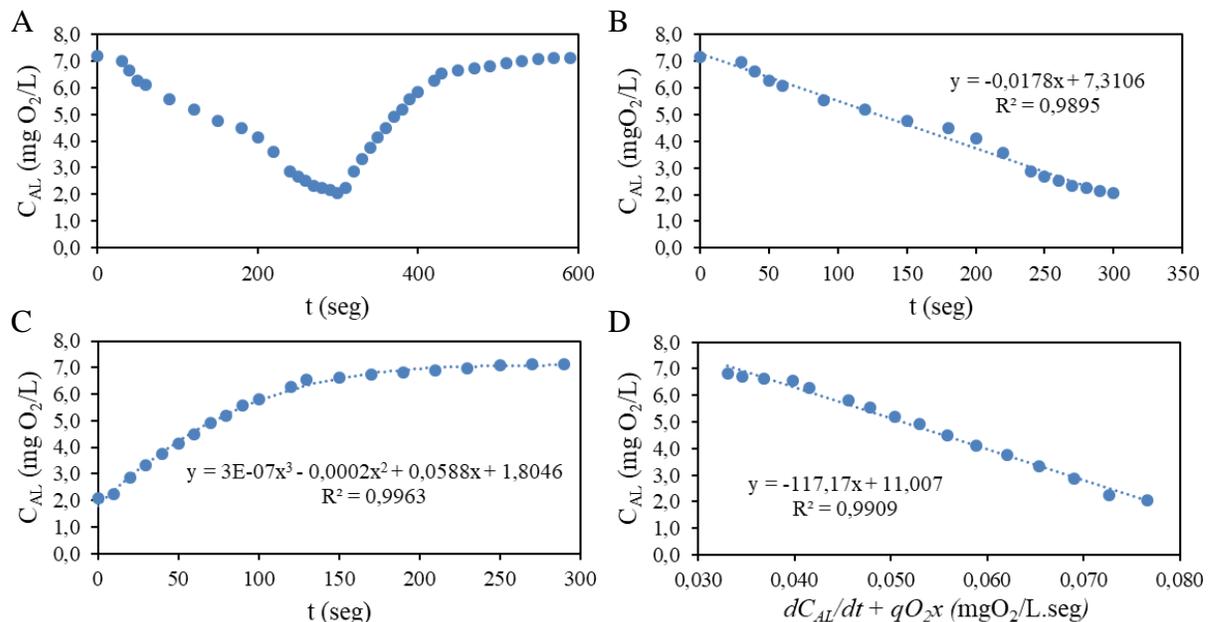


Figura 40. Proceso de medición de k_{La} . (A) Variación de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del tiempo (B) Corte del suministro de aire para determinación de qO_2x . (C) Etapa de reoxigenación del cultivo. (D) Determinación de k_{La} mediante la pendiente de la curva.

6 Producción de biomasa de levadura en medio optimizado basado en mosto de manzana en reactor con dos configuraciones: *batch* y semicontinuo

6.1 Reactor *batch* de 15 L

Para evaluar el crecimiento de la levadura en el medio de cultivo optimizado (MM, 44% v/v; KH_2PO_4 , 7,3 g/L y urea, 2 g/L) a mayor escala y evaluarla sobre la fruta en postcosecha, se creció la levadura en reactor con un volumen final de cultivo de 12 L. Se realizaron tres cultivos *batch* denominados reactor *batch* 1,2 y 3 (RB1, RB2, RB3) (Figura 41) para evaluar la aplicación de *V. victoriae* en línea de empaque comercial y rociar 400 kg de fruta con 1×10^8 UFC/mL. En la Tabla 38 se muestran los parámetros cinéticos y de producción de biomasa determinados. Los tres reactores presentan un comportamiento similar alcanzando producciones de biomasa superiores a 10 g/L, aunque presentan diferente cantidad de levaduras vivas por mL (10^7 - 10^9 UFC/mL).

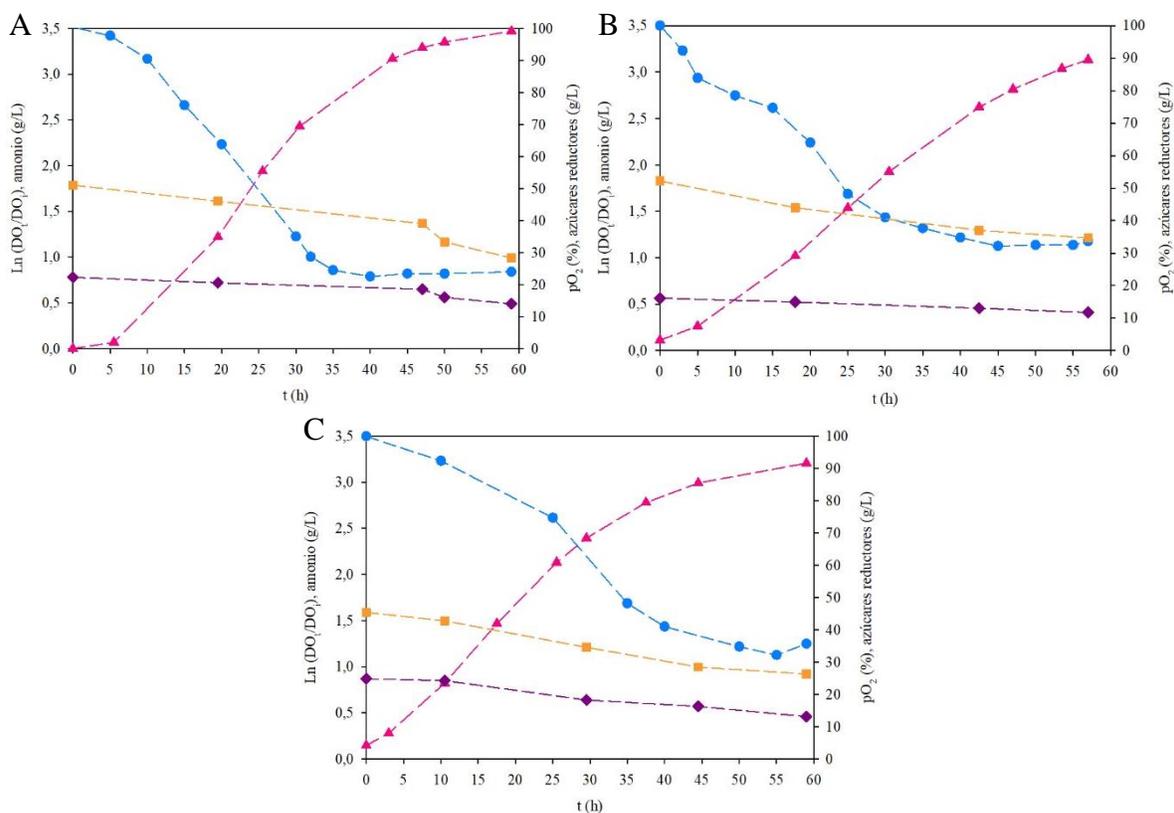


Figura 41. Curvas de crecimiento de los 3 reactores de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco (15 L) en medio optimizado. (A) RB1. (B) RB2. (C) RB3. Ln (DO_t/DO_i) (—▲—): DO_t: densidad óptica final de la levadura, DO_i: densidad óptica inicial de la levadura; amonio (g/L) (—◆—), azúcares reductores totales (g/L) (—■—); pO₂ (—●—): porcentaje de presión parcial de oxígeno. Curvas de crecimiento fueron modeladas por el modelo de Gompertz modificado.

Tabla 38. Parámetros cinéticos y de producción obtenidos en tres producciones de biomasa en reactor.

Reactor	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/mL	X (g/L)	Y _{X/S} (g _X /g _S)	P _v (g/L,h)
RB1	3,47	0,07	9,48	59	6,60x10 ⁷	10,39	0,46	0,18
RB2	3,61	0,06	4,35	57	6,67x10 ⁸	10,13	0,58	0,18
RB3	3,32	0,07	1,77	59	2,49x10 ⁹	10,33	0,54	0,18

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad específica de crecimiento máxima; A: Ln(DO_f/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; P_v: productividad volumétrica. Las curvas de crecimiento fueron modeladas por el modelo de Gompertz.

La biomasa se concentró por filtro tangencial, generando una pérdida de viabilidad del 11% únicamente en RB1, no se determinó pérdida de viabilidad sobre RB2 y RB3 luego del proceso. Este proceso tomó 15 días para RB1 y solo cinco para RB2 y RB3. Una vez filtrada la biomasa producida en cada reactor, se liofilizó utilizando el mejor crioprotector (GMS 1% v/v) y dos agentes protectivos definidos anteriormente y se almacenó hasta su aplicación en el ensayo en línea de empaque de peras postcosecha.

Las levaduras de *V. victoriae* son capaces de asimilar tanto glucosa como fructosa y utilizarlas aeróbicamente como fuente de carbono y energía (Figura 42). Se observa que la glucosa se consume en un 88%, mientras que la fructosa en un 18%. Por otro lado, el 100% de la sacarosa presente en el MM se desdobla para obtener los monosacáridos glucosa y fructosa. Esto representa un consumo total de azúcares del 45,7%. Estos azúcares cuantificados como monosacáridos y disacáridos (por método HPLC) resultaron ser similares a los obtenidos cuando los azúcares reductores totales (ART) se cuantifican por el método colorimétrico (DNS).

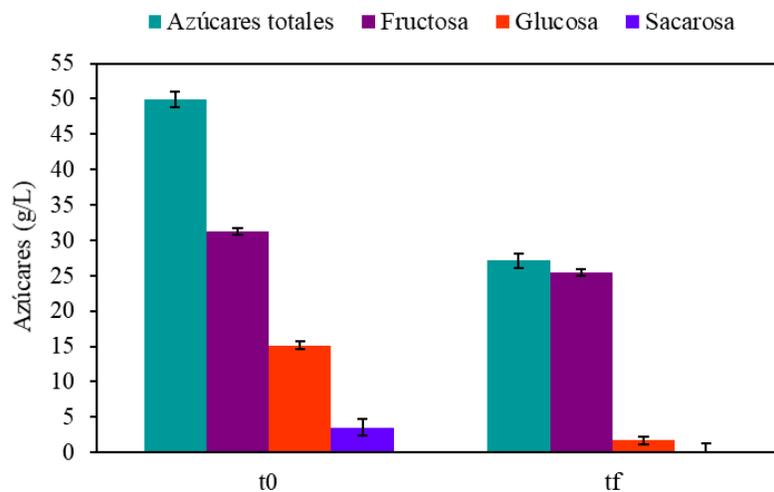


Figura 42. Contenido de azúcares en reactores *batch* de 12 L en cultivos de la levadura en medio optimizado MM. t₀ tiempo inicial y t_f: tiempo final. Cuantificados por HPLC.

6.1.1 Viabilidad de la biomasa liofilizada

La biomasa producida en los tres reactores se liofilizó utilizando las formulaciones seleccionadas en los ensayos de liofilización previos: i) GMS 1% v/v y SQP 30% p/v; ii) GMS 1% v/v y LDP 30% p/v. La biomasa fresca concentrada tenía una viabilidad promedio de $9,44 \times 10^9 \pm 6,32 \times 10^9$ UFC/mL. Se evaluó la protección de la viabilidad con GMS 1% p/v como crioprotector en combinación con SQP (30% p/v) y LDP (30% p/v), como protectivos. Luego de la liofilización, la biomasa rehidratada tenía al tiempo cero una viabilidad $5,5 \times 10^9 \pm 5,3 \times 10^9$ UFC/mL.

Por otro lado, se evaluó la viabilidad de la biomasa liofilizada cada 30 días hasta el momento de su aplicación en frutas (Tablas 39, 40 y 41). Se observó un efecto protector cuando LDP se empleó como protector en la biomasa liofilizada, ya que la pérdida de la viabilidad es significativamente inferior comparada con la del SQP a partir de los 30 días de conservación. Por otro lado, se observó que existe una alta variabilidad entre reactores, la biomasa que creció en el RB1 tiene una viabilidad a los 120 días mucho más baja (1,6%) que los reactores RB2 y RB3 (42-47% de viabilidad).

Tabla 39. Viabilidad de la biomasa de *V. victoriae* producida en RB1, empleando GMS 1% p/v como crioprotector y SQP y LDP como protectivos.

RB1				
Tiempo (días)	SQP 30% p/v		LDP 30% p/v	
	Viabilidad (%)	DS (\pm)	Viabilidad (%)	DS (\pm)
0	100a	22,13	100a	23,60
30	5,49a	1,56	16,93b	2,92
60	0,11a	0,02	10,22b	2,74
90	0,02a	0,002	2,10b	0,23
120	0,07a	0,031	1,60b	0,35

DS: desvió estándar. Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 40. Viabilidad de la biomasa de *V. victoriae* producida en RB2, empleando GMS 1% p/v como crioprotector y SQP y LDP como protectivos.

RB2				
Tiempo (días)	SQP 30% p/v		LDP 30% p/v	
	Viabilidad (%)	DS (\pm)	Viabilidad (%)	DS (\pm)
0	100a	31,79	100a	8,61
30	15,23a	2,07	90,38b	14,40
60	0,007a	0,002	60,40b	9,86
90	0,006a	0,003	47,70b	17,70

DS: desvió estándar. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 41. Viabilidad de la biomasa de *V. victoriae* producida en RB3, empleando GMS 1% p/v como crioprotector y SQP y LDP como protectivos.

RB3				
Tiempo (días)	SQP 30% p/v		LDP 30% p/v	
	Viabilidad (%)	DS (\pm)	Viabilidad (%)	DS (\pm)
0	100a	20,68	100a	21,16
30	14,71a	1,27	94,12b	18,72
60	0,006a	0,002	49,02b	16,57
75	0,006a	0,001	42,35b	9,67

DS: desvió estándar. Los valores dentro de una fila seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

6.2 Producción de biomasa en reactor semicontinuo

Se evaluó el sistema de configuración semicontinuo (RSC) para producción de biomasa de *V. victoriae* en el reactor de 15 L con el medio de cultivo optimizado basado en

MM. El RSC permite teóricamente obtener mayor cantidad de biomasa ya que reduce los tiempos y costos que conlleva producir más de un cultivo *batch*, permitiendo a su vez, evitar pérdida de viabilidad antes del ensayo en línea. Los resultados obtenidos muestran que la biomasa alcanzó la fase estacionaria luego de 127 h de cultivo (Figura 43), con tres recambios de medio de cultivo, alcanzado un volumen de producción de 27 L. Se determinaron los parámetros cinéticos y de producción de biomasa en cada una de las alimentaciones y al final del cultivo RSC (Tabla 42). El consumo total de azúcares fue de 45,75 g/L y 1,08g/L de nitrógeno observándose un mayor consumo en las últimas dos etapas de cultivo, el porcentaje de oxígeno disuelto alcanzó el 28,8% al final del cultivo. 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.

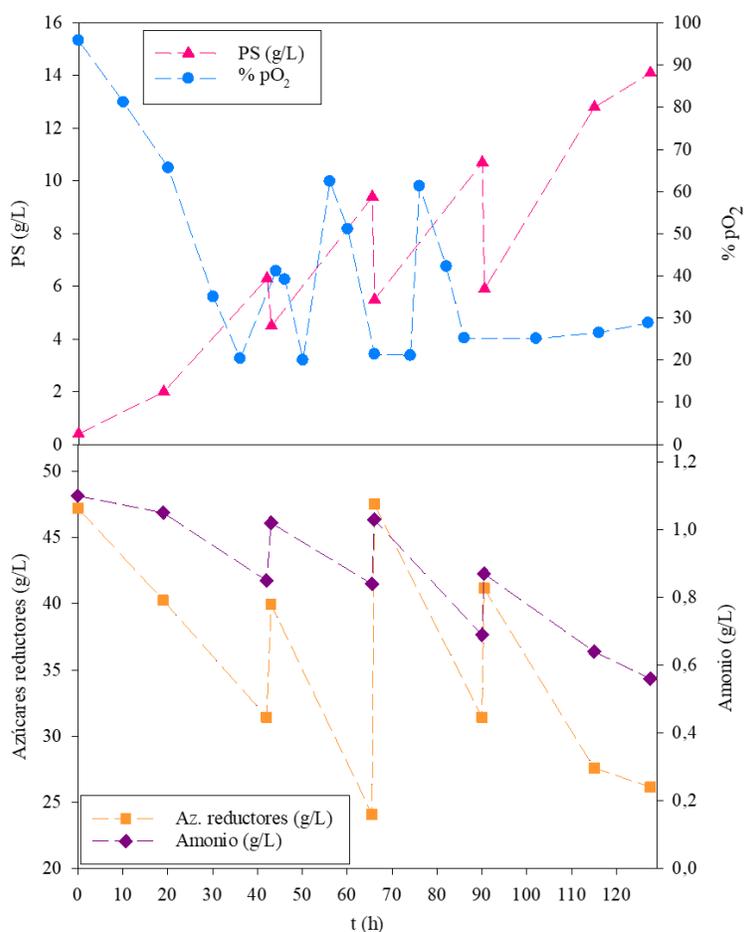


Figura 43. Producción de biomasa en reactor semicontinuo de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco en medio optimizado. pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno.

Tabla 42. Parámetros cinéticos y de producción obtenidos en reactor semicontinuo.

Reactor	Parámetros cinéticos				Parámetros de producción			
	A	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Lag (h)	t (h)	UFC/mL*	X (g/L)	Y _{X/S} (g _X /g _S)	P _v (g/L.h)
RB1	3,13	0,070	5,5			6,31	0,81	
RB2	3,53	0,031	-	127	7,90x10 ¹⁵	9,36	0,66	0,09
RB3	3,64	0,031	-			10,65	0,32	
RB4	3,88	0,029	-			14,11	0,54	

$\mu_{\text{máx}}$: 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; P_v : productividad volumétrica. *La suma de lo obtenido en cada uno de los *batch* del cultivo semicontinuo.

6.3 Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagónica de *V. victoriae* crecida en el medio de cultivo optimizado basado en MM se realizaron dos tratamientos en un empaque regional con manejo orgánico, **BF**: biomasa fresca producida en reactor semicontinuo y; **BLR**: biomasa liofilizada-rehidratada producida en reactor *batch*, ambos tratamientos con el agregado de 2% p/v de CaCl_2 y comparados con un tratamiento **Control** (agua de red + CaCl_2 2% p/v). Los ensayos fueron realizados sobre dos varietales: Packham's Triumph de pera y Red Delicious de manzana. Se emplearon bins con 1000-1400 unidades de peras con una presión de 16,4 lb y sólidos solubles de 12%. Cada bins de manzana contenía 1400-1900 frutas con una presión de 17 lbs y 12,5% de SS. Los tratamientos se conservaron durante seis meses en las correspondientes cámaras frías, respondiendo al manejo del empaque.

La incidencia total de las podredumbres, después de 150 días de almacenamiento en cámara frigorífica, en peras Packham's Triumph fue del 2,49% en el tratamiento control (sólo agua), en cambio la fruta tratada con la biomasa liofilizada-rehidratada (**BLR**) se redujo la incidencia total en 65,8%, es decir controló el 84% de incidencia causada por *Alternaria- Cladosporium* spp. y el 60% de incidencia causada por *P. expansum*, sin embargo, no fue capaz de controlar a *B. cinerea*. En las frutas tratadas con la biomasa fresca (**BF**), no se observó incidencia de enfermedades fúngicas (Figura 44, A), por lo que el control del tratamiento con levaduras fue del 100%. Luego de 180 días de almacenamiento en cámara fría, la incidencia total de las enfermedades fúngicas alcanzó el 2,76% en los tratamientos control. El tratamiento **BF** continuó con la tendencia observada a

los 150 días, controlando el 60% de las enfermedades fúngicas totales, redujo la incidencia causada por *Alternaria-Cladosporium* spp y *P. expansum*, alcanzando el 85,5% y 20,2% de control respectivamente.

El tratamiento **BLR** por su parte, controló el 81,1% del total de las enfermedades, controlando el 100% de las enfermedades causadas por *Alternaria-Cladosporium* spp, el 26,9% a *P. expansum* y el 51,3% a *B. cinerea* (Figura 44, B).

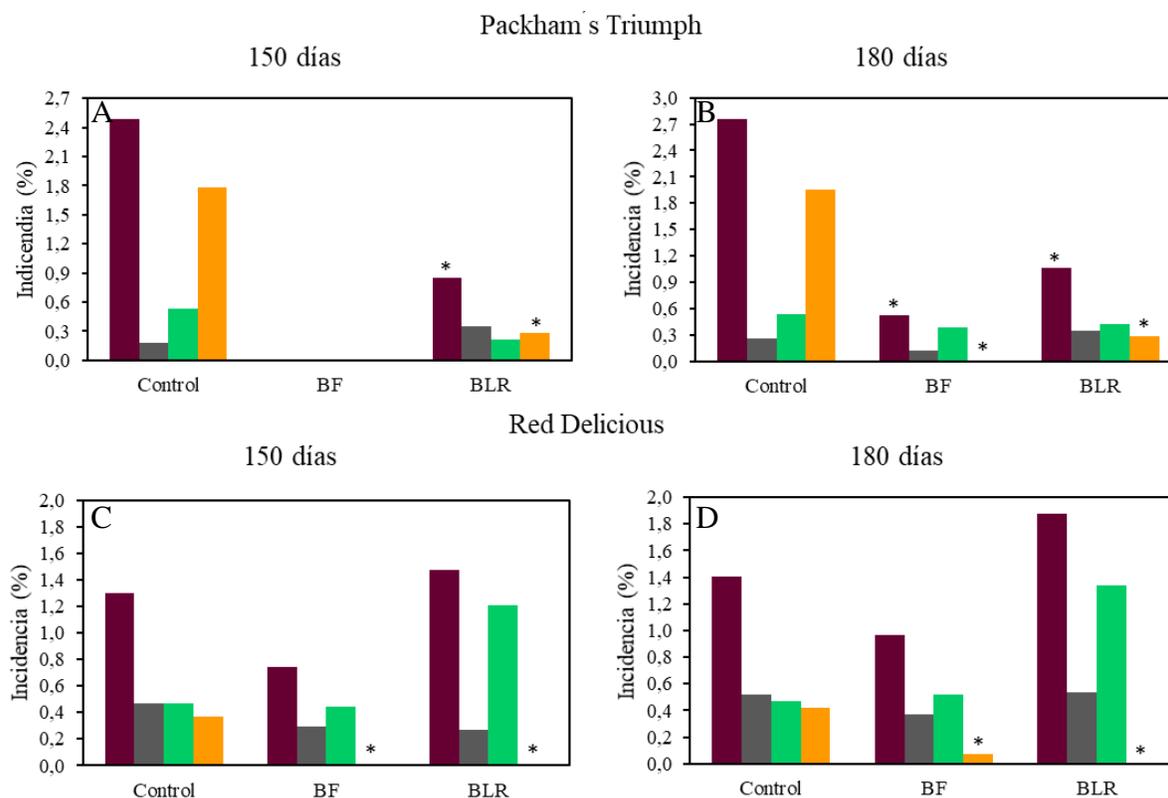


Figura 44. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total tras 150 (A y C) y 180 (B y D) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Packham's Triumph (A y B) y Red Delicious (C y D). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

Por otro lado, la incidencia total de enfermedades fúngicas en manzanas Red Delicious a los 150 días fue de 1,3% y solo el tratamiento **BF** logró controlar en un 36,5% a *P. expansum*, 4,7% a *B. cinerea* y el 100% a *Alternaria-Cladosporium* spp (Figura 44, C). A los 180 días, la incidencia total alcanzó el 1,41% y el mismo tratamiento logró controlar a *B. cinerea* en un 28,5%, *Alternaria-Cladosporium* spp al 100% y no pudo controlar a *P.*

expansum (Figura 44, D). Estos resultados muestran que el tratamiento **BF** es capaz de controlar en mayor medida las podredumbres causadas por los principales patógenos de peras y manzanas. Por otro lado, la misma levadura liofilizada-rehidratada (**BLR**) presenta menos eficacia en pera, mientras que en manzana Red Delicious no es capaz de controlar las enfermedades fúngicas.

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

Para evaluar si el sistema de aplicación de las levaduras (orificios pulverizadores) ejerce efectos 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 43). La cantidad inicial de levaduras viables 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 43), sin embargo, se observa en las levaduras liofilizadas-rehidratadas una disminución de 51-55% al pasar por los orificios pulverizadores (tratamiento **BLR**).

Luego de la aplicación de las levaduras sobre las frutas, se determinó el número de células de levadura en la superficie de las frutas en el tiempo inicial y durante los 180 días de conservación en cámara fría (Figura 45). Al inicio del ensayo, en la superficie de las peras Packham's Triumph se cuantificó un promedio de $2,4 \times 10^4$ UFC/fruta ($1,7 \times 10^2$ UFC/cm²), mientras que la superficie de Red Delicious contenía $2,7 \times 10^4$ UFC/fruta ($1,9 \times 10^2$ UFC/cm²).

Sobre el varietal Packham's Triumph se observó en el crecimiento de las levaduras **BLR** y **BF** una fase de latencia durante los primeros 30 días de conservación (Figura 45), luego el crecimiento es exponencial hasta los 50 días donde llega a fase estacionaria y en los dos casos la UFC de las levaduras se mantuvo constante hasta el final del período de conservación. En el tratamiento **BLR** las levaduras en la superficie aumentan en 0,8 unidades logarítmicas ($8,9 \times 10^2$ UFC/cm²), mientras que en el tratamiento **BF** 0,55 unidades logarítmicas (2×10^2 UFC/cm²).

Sobre el varietal de manzana Red Delicious, la fase de latencia se extiende durante los primeros 60 días de conservación, el crecimiento exponencial se da entre los 60 y 100 días de conservación hasta alcanzar la fase estacionaria que se extiende hasta el final del

período de conservación. En el tratamiento **BLR** el crecimiento de las levaduras fue de 0,5 unidades ($3,17 \times 10^2$ UFC/cm²) logarítmicas y de 0,46 para el tratamiento **BF** ($3,04 \times 10^2$ UFC/cm²).

Tabla 43. Concentración de *V. victoriae* en el tanque y a la salida del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial.

Tratamiento	Packham's Triumph		Red Delicious	
	Tanque (UFC/mL)	Salida (UFC/mL)	Tanque (UFC/mL)	Salida (UFC/mL)
BF	$5,50 \times 10^6$	$5,50 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$
BLR	$6,91 \times 10^7$	$3,83 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$

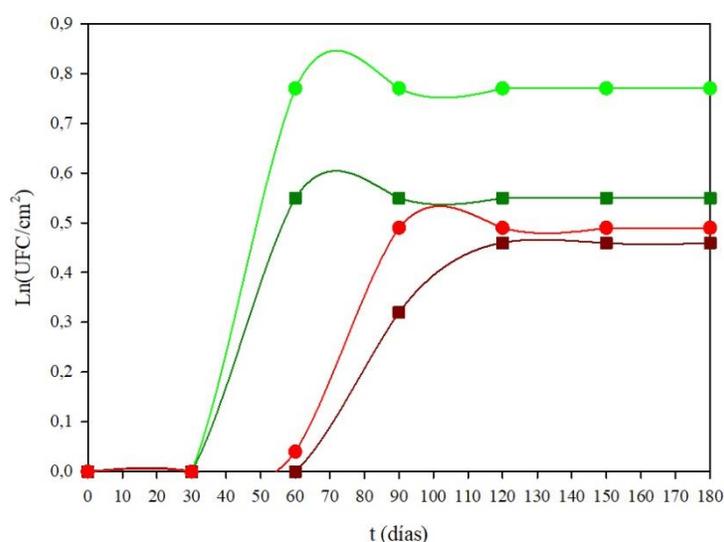


Figura 45. Crecimiento sobre la superficie de la fruta ($\text{Ln}(\text{UFC}/\text{cm}^2)$) durante el período de conservación en cámara frigorífica. Varietal Packham's Triumph: **BF** (—■—), **BLR** (—●—). Varietal Red Delicious: **BF** (—■—), **BLR** (—●—).

6.4 Ensayo en línea de empaque de producción convencional de fruta

Para evaluar la eficacia como ACB de *V. victoriae* se realizó un ensayo en un galpón de empaque con producción convencional de frutas. Se realizaron dos tratamientos, **BF**: biomasa fresca producida en reactor semicontinuo y; **BLR**: biomasa liofilizada-rehidratada producida en reactor *batch*, ambos tratamientos con el agregado de 2% p/v de CaCl_2 y comparados con un tratamiento **Control** (agua de red + CaCl_2 2% p/v). Se emplearon dos variedades: Packham's Triumph de pera (bins con 1600-1800 frutas) y Red Delicious de manzana (bins con 1000-1400).

Luego de 150 días de almacenamiento en cámaras frías, se observó en Packham's Triumph una incidencia de 1,1% de las enfermedades fúngicas en el tratamiento control,

mientras que en el tratamiento **BLR** la incidencia total fue de 1,08%. El tratamiento **BLR** no logró controlar a *P. expansum*, pero si a *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 17,9% y 65,8% respectivamente (Figura 46, A). Luego de 180 días de conservación la incidencia de las enfermedades fue mayor en el tratamiento **BLR** en comparación con el tratamiento control. La levadura no fue capaz de controlar ninguna de las enfermedades (Figura 46, B).

Sobre el varietal Red Delicious, la incidencia de enfermedades fúngicas en las manzanas luego de 150 días de conservación fue muy baja, alcanzando el 0,53% en el tratamiento control, 0,7% para **BF** y 0,14% para **BLR**. El tratamiento **BLR** redujo significativamente la incidencia total y de *B. cinerea*, alcanzando porcentajes de control del 47,3% y 100% respectivamente (Figura 46, C). Luego de 180 días, los porcentajes de incidencia aumentan considerablemente en todos los tratamientos. El tratamiento **BF** no logra controlar ninguna de las enfermedades mientras que el tratamiento **BLR** controla el total de las enfermedades en 38,5% y a *B. cinerea* en 73,7% con respecto al tratamiento control (Figura 46, D).

6.4.1 Aplicación y colonización por levaduras de la superficie de la fruta almacenada en frío

El recuento de levaduras viables se realizó en agua del tanque de tratamiento y en el agua pulverizada mediante el sistema de aplicación de tubo de PVC perforado. Las cantidades iniciales de levaduras aplicadas en los tratamientos **BF** y **BLR** en la línea de empaque no se redujeron de manera significativa cuando estas pasaron a través del sistema de aplicación (Tabla 44). Al inicio del ensayo, la superficie de las peras contenía una media de $1,5 \times 10^3$ UFC/fruto (3×10^1 UFC/cm²) con el tratamiento **BLR**. En el caso de las manzanas la superficie contenía una media de 7×10^3 UFC/fruto ($1,4 \times 10^2$ UFC/cm²) con **BF** y $1,3 \times 10^4$ UFC/fruto ($2,5 \times 10^2$ UFC/cm²) con **BLR**. Los valores de UFC/cm² disminuyeron progresivamente durante los 180 días de conservación. En el caso del tratamiento **BLR**, los recuentos descienden a 11 UFC/cm² en el varietal Packham's Triumph, mientras que en Red Delicious descienden a 4 UFC/cm² en el tratamiento **BF** y en el tratamiento **BLR** descienden a 12 UFC/cm². La baja concentración de UFC/cm² tanto en pera como en

manzana se ve reflejado en los bajos porcentajes de control de las diferentes enfermedades fúngicas.

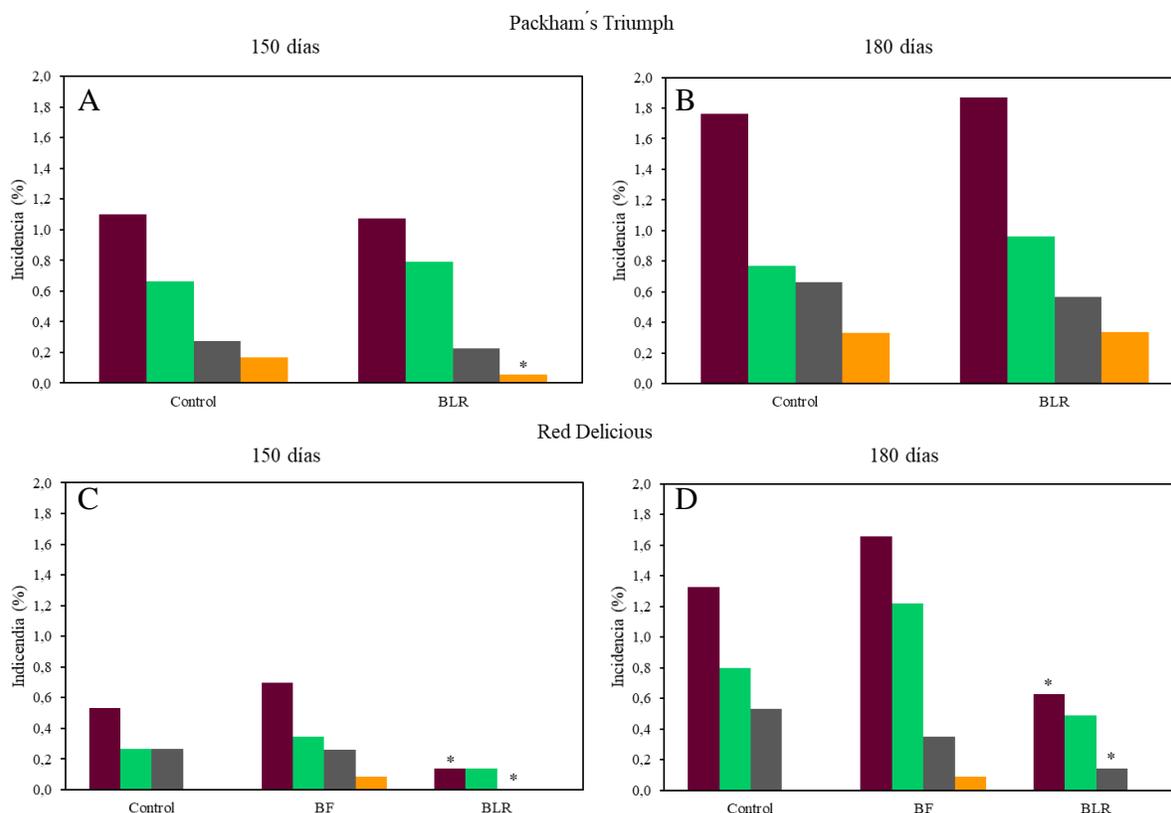


Figura 46. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total tras 150 (A y C) y 180 (B y D) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica en el varietal Packham's Triumph (A y B) y Red Delicious (C y D). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl₂ 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

Tabla 44. Efecto del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de las levaduras y concentración de *V. victoriae*.

Tratamiento	BF		BLR	
	Red Delicious	Packham's Triumph	Red Delicious	Packham's Triumph
Tanque (UFC/mL)	1,50x10 ⁶ a	1,25x10 ⁶ a	1,21x10 ⁶ a	1,23x10 ⁶ a
Pico (UFC/mL)	9,45x10 ⁵ a	1,23x10 ⁶ a	7,95x10 ⁵ a	1,23x10 ⁶ a

Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

7 Producción de biomasa en reactor semicontinuo

En comparación con el cultivo *batch*, el cultivo semicontinuo permite obtener concentraciones de biomasa mucho mayores, reducir tiempos muertos (limpieza, esterilización y fase *lag*). Por todo ello, se decidió continuar con la producción de biomasa únicamente en RSC (Figura 47).

En la Tabla 45 se muestran los parámetros cinéticos y de producción de biomasa determinados en cada una de las alimentaciones y al final del cultivo. El consumo total de azúcares fue de 51,09 g/L y de nitrógeno 1,15 g/L observándose un mayor consumo en las últimas dos etapas de cultivo, el porcentaje de oxígeno disuelto alcanzó el 31% al final del cultivo (Figura 47). Finalizado el cultivo, la biomasa se concentró por medio del filtro tangencial durante cinco días, lo que generó una pérdida de viabilidad del 95%. La biomasa concentrada se almacenó en heladera durante 30 días hasta su aplicación.

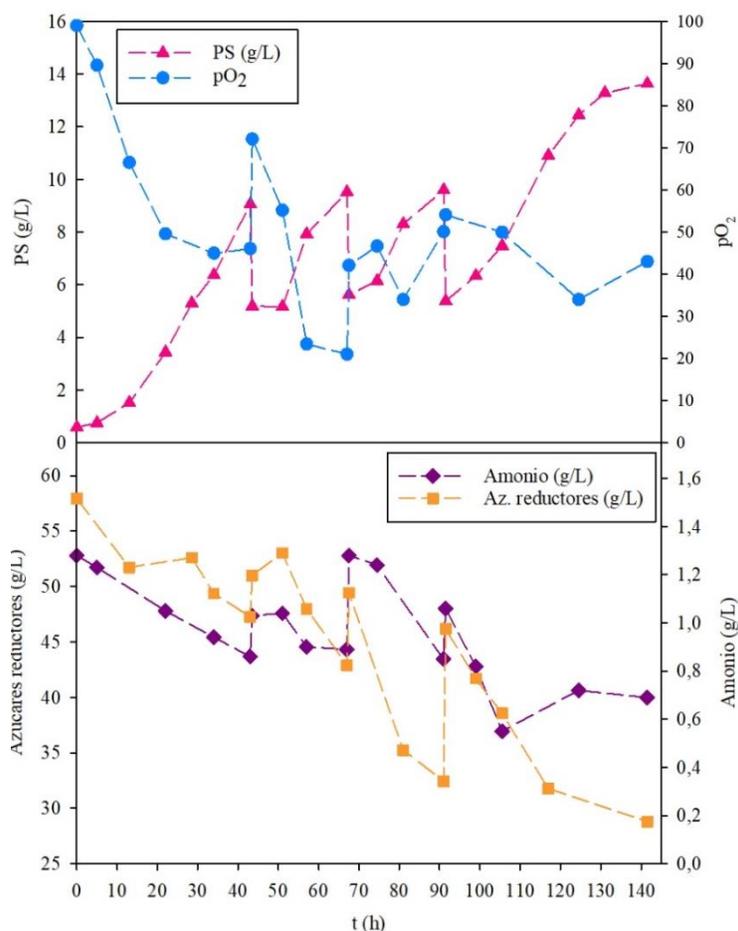


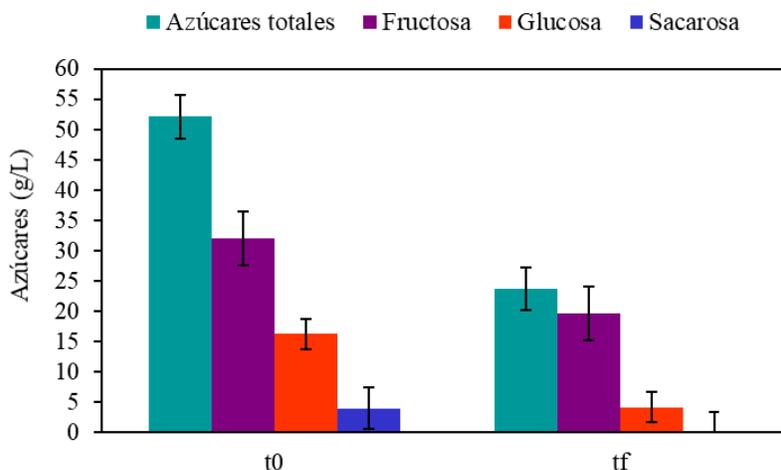
Figura 47. Producción de biomasa en reactor semicontinuo de *V. victoriae* a 20°C en un biorreactor a escala de banco en medio optimizado. pO₂: porcentaje de presión parcial de oxígeno.

Tabla 45. Parámetros cinéticos y de producción obtenidos en RSC

Reactor	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)	P _v (g/L.h)
RB1	2,69	0,069	5	141	2,70x10 ¹⁰	9,06	0,79	0,08
RB2	2,77	0,037	-			9,52	0,53	
RB3	2,72	0,035	-			9,60	0,23	
RB4	2,96	0,029	-			13,64	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; P_v : productividad volumétrica. *La suma de lo obtenido en cada uno de los *batch* del cultivo semicontinuo.

Las levaduras de *V. victoriae* son capaces de asimilar tanto glucosa como fructosa y utilizarlas aeróbicamente como fuente de carbono y energía (Figura 48). 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 desdobla para obtener los monosacáridos glucosa y fructosa; esto representa un consumo total de azúcares del 54,6%.

**Figura 48.** Contenido de azúcares de los cultivos de levaduras en RSC determinados en medio optimizado MM, t₀ tiempo inicial y t_f: tiempo final. Cuantificados por HPLC.

7.1 Ensayo a escala semicomercial en línea de empaque de producción orgánica

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de *V. victoriae* crecida en el medio de cultivo optimizado se realizó un único tratamiento, **BF**: biomasa fresca producida en RSC con el agregado de 2% de CaCl₂ sobre dos variedades de pera Packham's Triumph y Beurré D'Anjou en un empaque regional con manejo orgánico. Cada bins de Packham's Triumph contenía 1700-2300 frutas, con una presión de 12,8 lb y contenido de SS de 15%,

mientras que cada bins de Beurré D'Anjou contenía 1800-2300 frutas con una presión de 12,4 lb y 14% de SS. La incidencia natural del total de las enfermedades fúngicas (Figura 49) sobre el varietal Beurré D'Anjou alcanzó el 2,61% en el tratamiento control, mientras que en el tratamiento **BF** la incidencia total fue del 1,5% luego de 100 días de conservación. El tratamiento **BF** logra reducir la incidencia de *P. expansum* y *Alternaria-Cladosporium* spp., controlando dichas enfermedades en un 80,6% y 54,1% respectivamente, mientras que no se observa incidencia de *B. cinerea* (Figura 49, A). Luego de 150 días de conservación la incidencia total en el tratamiento control alcanzó 4,45%, mientras que en el tratamiento **BF** fue de 3,04%. Al igual que a los 100 días de conservación, el tratamiento **BF** logró controlar las enfermedades causadas por *P. expansum* y *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 82% y 27,5% respectivamente. No se observa incidencia de *B. cinerea* en el tratamiento **BF**, por lo que el control sobre esta enfermedad fue del 100% (Figura 49, B).

En el varietal Packham's Triumph la incidencia natural de las enfermedades fúngicas se observó a los 150 días de conservación. En el tratamiento control la incidencia total fue del 6,31% y en el tratamiento **BF** del 4,1%. El tratamiento **BF** logró controlar únicamente la enfermedad causada por *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 55,9% (Figura 49, C).

7.2 Aplicación y colonización por levaduras de la superficie de la fruta almacenada en frío

Las cantidades iniciales de levaduras viables aplicadas en la línea de empaque no se redujeron de manera significativa cuando estas pasaron a través del sistema de aplicación (Tabla 46). Al tiempo inicial, las peras Packham's Triumph contenían una media de $7,5 \times 10^4$ UFC/fruta ($5,6 \times 10^2$ UFC/cm²) y en las Beurré D'Anjou se cuantificó una media de $1,1 \times 10^5$ UFC/fruta ($7,3 \times 10^2$ UFC/cm²).

Se determinó el número de levaduras viables en la superficie de la fruta durante todo el período de conservación (Figura 50). Durante los primeros 60 días de conservación se observa un crecimiento exponencial de las levaduras sobre la fruta, luego este valor disminuye levemente y se mantiene constante entre los 100 y 150 días de almacenamiento. En el tiempo final de conservación se observó respecto a la cantidad de levaduras iniciales

un aumento de 1,3 unidades logarítmicas: $2,2 \times 10^3$ UFC/cm² en el varietal Packham's Triumph y $2,4 \times 10^3$ UFC/cm² en el varietal Beurré D'Anjou.

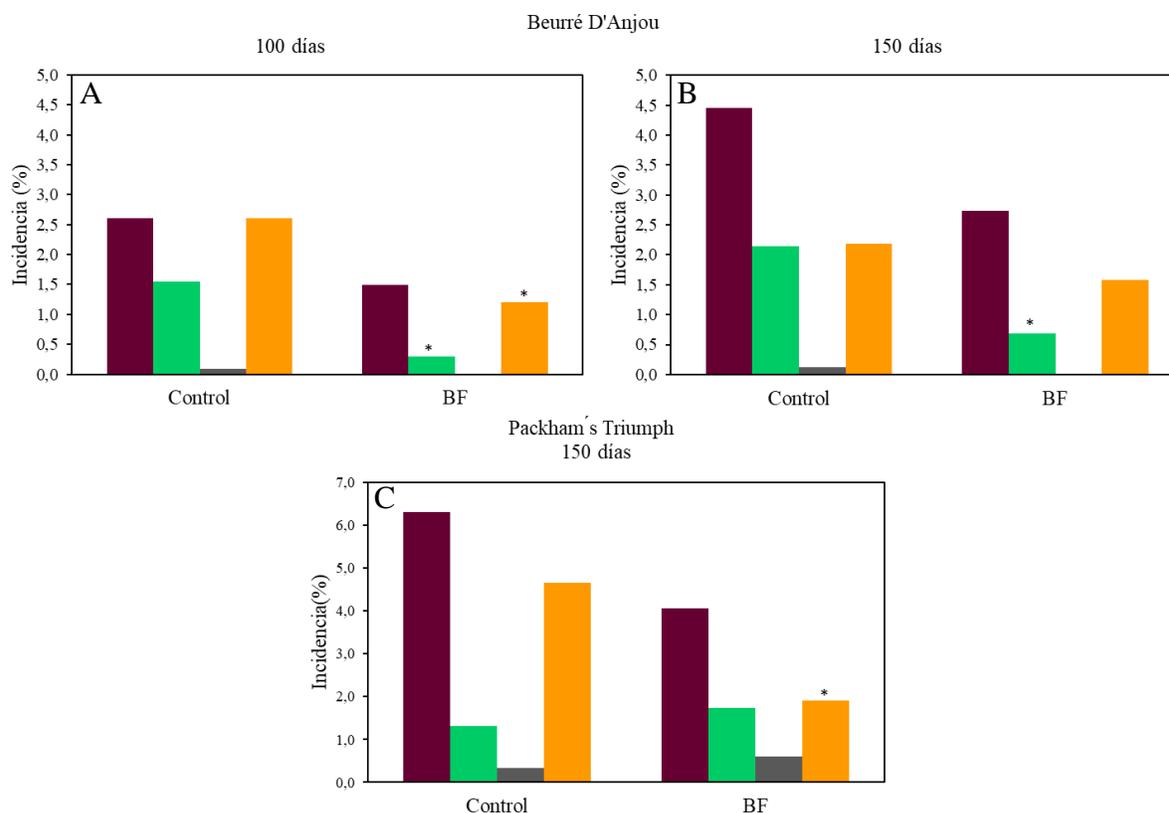


Figura 49. Efecto de los tratamientos con levaduras sobre la incidencia natural total tras 100 (A) y 150 (B y C) días de almacenamiento a $-1/0^{\circ}\text{C}$ y 95% HR en cámara frigorífica para el varietal Beurré D'Anjou (A y B) y Packham's Triumph (C). Enfermedades evaluadas: Incidencia total (■), *P. expansum* (■), *B. cinerea* (■) y *Alternaria-Cladosporium* spp (■). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre el tratamiento y el control (agua + CaCl_2 2%) según el modelo lineal generalizado de distribución binomial ($p < 0,01$; GLM).

Tabla 46. Efecto del sistema de aplicación en la línea de empaque comercial sobre la viabilidad de las levaduras y concentración de *V. victoriae*.

Tratamiento	BF	
	Packham's Triumph	Beurré D'Anjou
Tanque (UFC/mL)	$1,90 \times 10^6 \text{a}$	$3,50 \times 10^6 \text{a}$
Pico (UFC/mL)	$1,75 \times 10^6 \text{a}$	$3,50 \times 10^6 \text{a}$

Los valores dentro de una columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

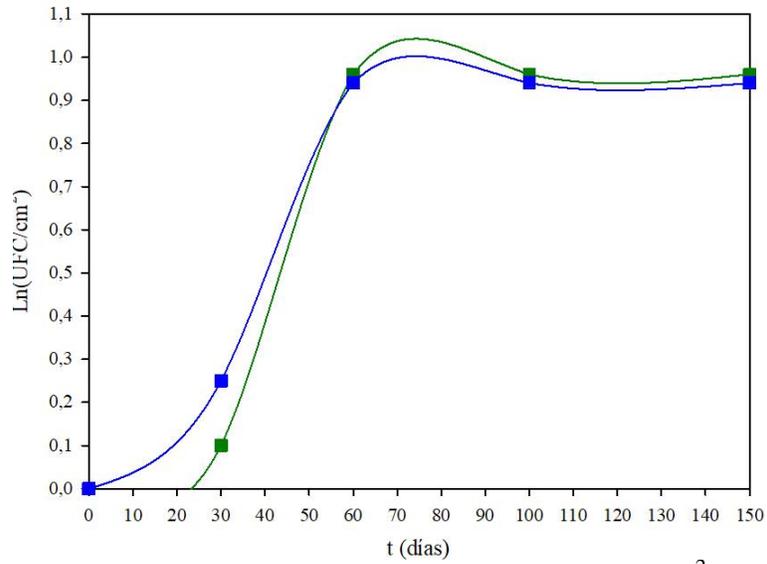
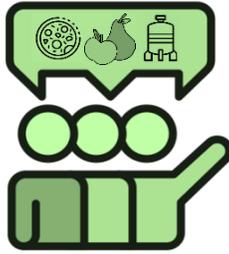


Figura 50. Crecimiento sobre la superficie de la fruta ($\text{Ln (UFC/cm}^2\text{)}$) durante el período de conservación en cámara frigorífica. Varietal Packham's Triumph (■), varietal Beurré D'Anjou (■).

DISCUSIÓN



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).

Hasta la fecha existe una gran cantidad de bibliografía sobre el aislamiento, la selección, la eficacia y el modo de acción de diversos ACB para enfermedades postcosecha de frutas (Janisiewicz et al., 2000; Mathivanan, 2023; Ruiz-Moyano et al., 2016; Sun et al., 2018; Tulukoğlu-Kunt et al., 2023; Vargas et al., 2012), pero pocos de ellos describen la producción a gran escala del ACB (Long et al., 2006; Patiño-Vera et al., 2005; Prabakaran & Hoti, 2008), la formulación comercial (Melin et al., 2011; Navarta et al., 2014; Teixidó et al., 2022; Torres et al., 2014) y aplicación a escala semicomercial del tratamiento con ACB (Carvalho Castro et al., 2020; Lutz et al., 2020; Marsico et al., 2021; Zhang et al., 2010b).

En esta Tesis se optimizaron dos medios de cultivo basados en residuos de la industria alimentaria, con el fin de obtener de manera económica y sustentable, la cantidad necesaria de biomasa de la levadura para evaluar su efectividad antagonista a escala semicomercial, apuntando al desarrollo a escala industrial de este ACB. La producción de *V. victoriae* se llevó a cabo a escala laboratorio con volúmenes de producción de 12 L en reactor *batch* y de 27 L en reactor semicontinuo. Considerando que la producción de biomasa a gran escala es un requisito necesario para llevar a cabo la aplicación de los ACB a nivel comercial, se realizó el escalado a nivel piloto alcanzando un volumen de cultivo de 100 L.

1 Optimización de medios de cultivo y producción de biomasa

En los últimos años se ha incrementado el uso de residuos de distintas industrias alimentarias, 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). Con el objetivo de optimizar medios de cultivos para el crecimiento de la levadura, se emplearon dos residuos: suero de queso en polvo (SQP) y mosto de manzana (MM). Estos residuos se evaluaron en distintas concentraciones, con el agregado de algunas sales, para evaluar el crecimiento de la levadura a escala Erlenmeyer y de reactor, así como también la capacidad antagónica de las levaduras crecidas en las mejores condiciones de cultivo (condición optimizada).

La optimización de la producción de biomasa y la reducción de costos se incluyen en el análisis estratégico de la factibilidad del proceso biotecnológico. El uso de Diseños Estadísticos Experimentales proporciona información confiable, permite visualizar las interacciones entre varias variables experimentales, ayuda a predecir variables de entrada que son estadísticamente significativas, estimar su magnitud y determinar los valores que maximizan la respuesta. Por último, tras la construcción y optimización del modelo, debe verificarse el óptimo predicho (Armando et al., 2013; Pelinski et al., 2012).

En el grupo de investigación donde se desarrolló esta Tesis, se llevó a cabo la producción de *V. victoriae* en un medio de cultivo basado en melaza (Lutz, 2015; Gramisci, 2019). Sin embargo, la composición de la melaza 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 de obtención y en ocasiones puede presentar sustancias tóxicas para el crecimiento de las levaduras (Gomez-Pastor et al., 2011). Buscando otras alternativas de residuos agroindustriales, en esta Tesis se demuestra que tanto el SQP como el MM son residuos que pueden ser utilizados para la producción de biomasa de esta levadura, incluso a escala industrial por su alta disponibilidad (Bosso et al., 2020; Gramisci, 2019).

La característica más importante de un ACB es su capacidad biocontroladora, esta se ve influida por varios factores, entre ellos: el acondicionamiento fisiológico del antagonista durante su desarrollo, la formulación del mismo, la fruta sobre la cual se hace la aplicación, maduración de la fruta tratada, severidad de la herida y condiciones ambientales (Janisiewicz & Marchi, 1992; Droby et al, 2016; Dukare et al., 2018). Por lo tanto, es importante la evaluación de la capacidad antagónica de las levaduras en condiciones de almacenamiento postcosecha comerciales, en cada ocasión que uno modifica el

acondicionamiento fisiológico al variar las condiciones de crecimiento y conservación. Por esta razón, se realizaron a lo largo de esta Tesis más de veinticinco ensayos a escala comercial para evaluar la capacidad antagónica del ACB en peras o manzana, así mismo, comparar si el ACB conservaba su eficacia como antagonista en los diferentes medios de cultivo propuestos, sistemas de producción empleados y métodos de formulación diferentes.

1.1 Optimización de un medio de cultivo basado en suero de queso en polvo

Los estudios de optimización de un medio de cultivo de bajo costo son contribuciones relevantes para el posterior diseño de un proceso de producción a gran escala (Yáñez-Mendizábal, 2012). Se han descrito pocos trabajos que incluyan desde la optimización del medio de cultivo económico, la producción en masa a gran escala, el proceso *downstream*, el plan de formulación (líquido o sólido) y la evaluación como ACB a escala comercial. Wang et al. (2011) optimizaron estadísticamente un medio a base de melaza de caña para la producción de biomasa del agente de biocontrol *Rhodosporidium paludigenum*, luego llevaron a cabo la producción en reactor de 10 L y finalmente evaluó la eficacia de biocontrol de la levadura tras la optimización del cultivo. Patiño-Vera et al. (2005) escalaron de 10 L a 100 L el proceso de producción de *Rhodotorula minuta* utilizando un medio de cultivo económico, evaluó la formulación líquida utilizando distintas combinaciones de glicerol y xantano, por último comprobaron la eficacia del ACB en ensayos a escala comercial. Manso et al. (2010) optimizaron las condiciones para la producción de biomasa del ACB *Pantoea agglomerans* PBC-1 en reactor y evaluaron la eficacia de la biomasa producida en manzanas y naranjas.

En esta Tesis inicialmente se evaluó el crecimiento de la levadura con medio basado en SQP, dextrosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 y KH_2PO_4 en ocho combinaciones distintas. Una de estas combinaciones (SQP 60 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, MgSO_4 0,25 g/L y KH_2PO_4 5 g/L) fue la que presentó mejor producción de biomasa, rendimiento y productividad, por lo tanto, esta condición fue seleccionada para producir biomasa en biorreactor. Se llevaron a cabo dos reactores con este medio de cultivo, los resultados obtenidos muestran una disminución en la fase *lag* y del peso seco (g/L), pero un aumento en el rendimiento ($Y_{X/S}$) cuando se compara con la producción a nivel de frascos (Tabla 7 y 8). Sin embargo, la productividad

(P_v) resulta igual en ambas escalas, ya que se logra obtener una concentración de biomasa igual en el tiempo de cultivo (g/L.h). Las condiciones generadas dentro del reactor, como mejor agitación, aireación y distribución del aire, tasa de transferencia de oxígeno y de materia son condiciones que no se generan en los frascos Erlenmeyer (Doran, 2013; Patiño-Vera et al., 2005).

Al momento de determinar la concentración de células viables, estas alcanzan un valor de $6,62 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$ UFC/mL a nivel de reactor. Considerando que los reportes bibliográficos indican que las levaduras son eficaces cuando se aplican a una concentración de entre 10^7 y 10^9 UFC/mL y rara vez son necesarias concentraciones más elevadas (El-Ghaouth et al., 2003; Long et al., 2005; Lutz et al., 2020), lo obtenido a nivel de reactor de 12 L es suficiente para poder realizar ensayos de actividad antagonista del ACB sobre un bins de frutas (1000-1500 frutos).

Con el objetivo de optimizar un medio de cultivo para el crecimiento de *V. victoriae* basado en SQP, se realizó un DCC con puntos estrellas y tras el análisis se determinó que las condiciones que maximizan la producción de biomasa fueron: SQP, 80 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 g/L; KH_2PO_4 , 10 g/L. Para validar este medio de cultivo, se realizaron seis experimentos y se calcularon los valores A_f y B_f . Se obtuvo un valor de 1,13 y 0,91 para A_f y B_f respectivamente, estos resultados mostraron una discrepancia del 11% y 9% respectivamente cuando se compararon los valores observados y los predichos, los valores obtenidos son muy cercanos a 1 por lo que permiten confirmar la validación (Bravo et al., 2019; Mellefont et al., 2003).

A escala laboratorio, los siete reactores *batch* de 12 L realizados con el medio optimizado tuvieron un comportamiento similar entre ellos y alcanzaron valores cercanos en sus parámetros cinéticos y de producción (Tabla 12, 16 y 19). Se destacan dos reactores *batch* (Tabla 16) con una mayor producción de biomasa (15 g/L) y productividad volumétrica

(0,2 g/L.h), pero con similar número de levaduras viables ($1-3 \times 10^9$ UFC/mL) que el resto de los reactores realizados. Los resultados obtenidos con el medio de cultivo optimizado son mejores cuando se comparan con los obtenidos en el medio no optimizado, esto se ve reflejado principalmente en el aumento de la productividad volumétrica (P_v), rendimiento ($Y_{x/s}$), viabilidad (UFC/mL) y disminución en la fase *lag*. Un parámetro importante es la

concentración de células viables alcanzadas en el reactor (UFC/mL), con el medio optimizado se obtuvieron $1,7 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^9$ UFC/mL (Tabla 47), lo que representa un incremento de 2,5 veces con respecto al medio no optimizado (Tabla 8).

La mayoría de los estudios se centran en la aplicación de manera separada del suero de queso. Por un lado, de la proteína del suero y por otro la lactosa, para configurar procesos que permitan generar productos de valor agregado (Lappa et al., 2019), con un marcado interés en la capacidad de distintos microorganismos de fermentar la lactosa en etanol (Farkas et al., 2019; Ozmihci & Kargi, 2007a; Yamahata et al., 2020). Sin embargo, existe poca bibliografía sobre el uso de SQP como sustrato para la producción de biomasa (Aouidi et al., 2010; Ferrari et al., 2001; Mahmood, 2015; Prajapati et al., 2017; Vamvakaki et al., 2010), en donde ninguno de los microorganismos estudiados es utilizado como ACB.

1.1.1 Comparación de escalas

Cuando se evalúa el escalado en la producción de un ACB se debe obtener la mayor cantidad de biomasa en periodos cortos de tiempo y en un sustrato económico (Nunes, 2012; Patiño-Vera et al., 2005; Teixidó et al., 2022). Los parámetros cinéticos y de producción de biomasa en cada condición de cultivo y escala de producción pueden resultar diferentes, aunque se trate de la misma levadura, debido a que estos parámetros varían con la composición general del medio de cultivo (fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas), entre otros factores involucrados como la aireación, agitación, temperatura, etc. (Acevedo et al., 2002; dos Santos, 2007).

En esta Tesis se realizaron dos configuraciones de reactor para producir biomasa en medio de cultivo optimizado basado en SQP (reactor *batch* y semicontinuo) a dos escalas (banco y piloto). A escala laboratorio, el reactor semicontinuo alcanzó mejores resultados en cuanto a UFC totales y productividad volumétrica (Tabla 47), disminuyendo los tiempos de producción, en comparación con el reactor *batch* convencional (Tabla 8, 12, 16 y 19). Esta mejor productividad puede deberse a que el RSC solo presenta fase *lag* al inicio del cultivo, los sucesivos recambios de medio de cultivo no poseen fase *lag*, ya que las levaduras están adaptadas al medio. La concentración de azúcares, amonio y oxígeno aumentan con cada recambio de medio de cultivo, mientras que la concentración de biomasa disminuye (Figura 28 y 30). Esto genera que la velocidad específica de

crecimiento disminuya a medida que avanza el cultivo, si bien las células están en crecimiento exponencial, las que permanecen en el reactor cuando se adiciona medio de cultivo, tienen una menor capacidad de metabolizar los sustratos adicionados y por lo tanto una velocidad de duplicación menor (Tabla 48).

Tabla 47. Comparación de producción de biomasa en distintas escalas.

	Modelo Reactor <i>batch</i>¹	Prototipo Reactor <i>batch</i>	Reactor Semicontinuo²
Volumen (L)	12	100	27
t cultivo (h)	72 ± 6	70	112 ± 9,90
DO _{máx}	44 ± 15,50	51	39 ± 9,50
Biomasa total (g)	127,30 ± 38	2070	244,50 ± 33
Biomasa (g/L)	10,60 ± 3,20	20,70	9,1 ± 1,20
UFC total	2,1x10 ¹³ ± 1,8x10 ¹³	1x10 ¹⁶	4,7x10 ¹⁷ ± 4,6x10 ¹⁷
UFC/mL	1,7x10 ⁹ ± 1,5x10 ⁹	2,6x10 ¹⁰	3,9x10 ¹³ ± 1,4x10 ¹³
P _v (g/L.h)	0,15 ± 0,04	0,30	0,08 ± 0,004
Consumo azúcar (g/L)	20 ± 8,10	34,30	42,54 ± 8,28
Consumo amonio (g/L)	0,29 ± 0,11	0,23	0,61 ± 0,09
Y _{X/S}	0,44 ± 0,20	0,61	-*
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,07 ± 0,01	0,07	-*
k _{La} (h ⁻¹)	23,72	25,20	23,72

*ver datos en Taba 46. 1: promedio de siete RB en medio optimizado con SQP. 2: promedio de dos RSC en medio optimizado con SQP.

Tabla 48. Rendimientos (Y_{X/S}) y μ_{máx} en cada una de las etapas de los reactores semicontinuos.

RB1	Y _{X/S}	0,45 ± 0,03	μ _{máx1}	0,08 ± 0,01
RB2	Y _{X/S}	0,60 ± 0,17	μ _{máx2}	0,06
RB3	Y _{X/S}	0,25 ± 0,18	μ _{máx3}	0,02
RB4	Y _{X/S}	0,76 ± 0,29	μ _{máx4}	0,02

Los resultados experimentales fueron reproducibles tanto a escala laboratorio (12 L) como en escala piloto (100 L). Al pasar a escala piloto, resultados muestran que la producción de biomasa a esta escala permite obtener productividades mayores a las obtenidas en los reactores *batch* y RSC a escala laboratorio (Tabla 47). El tiempo de duplicación disminuye, aumentado la velocidad específica de crecimiento máxima, alcanzando una mayor concentración de biomasa en un tiempo similar a los reactores *batch* (Tabla 47). Esta mejora general en la producción de biomasa puede estar relacionada a la mejor transferencia de oxígeno que presenta el reactor P dado a su mayor k_{La}. La

transferencia de oxígeno se elige comúnmente como criterio principal de escalado, siendo la aireación y la agitación variables importantes, resultando necesario conocer el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) (Doran, 2013; Garcia-Ochoa & Gomez, 2009). Requiere un análisis cuidadoso extrapolar los resultados que se obtendrían a escala industrial, a partir de los datos obtenidos a escala de laboratorio y/o planta piloto. La escala piloto se asemeja más a la escala comercial en términos de equipamientos necesarios y procesamiento *downstream* (Liu et al., 2016), pocas publicaciones se centran en el escalado a grandes volúmenes, particularmente en volúmenes mayores a 100 litros, ya que muchos trabajos entran en secreto de desarrollo a nivel industrial.

Los resultados obtenidos, utilizando SQP resultan similares cuando se comparan con los obtenidos en bibliografía. Mahmood et al. (2015) obtuvieron concentraciones de biomasa superiores a 10,7 g/L con *K. fragilis* y *K. marxianus*. Bosso et al. (2019) obtuvieron 10,56 g/L de biomasa, alcanzando un rendimiento de 0,86 g_B/g_S y una velocidad de crecimiento de 0,31 h⁻¹ con *S. fragilis*. Özmihçi, (2009) obtuvo entre 5,1 y 10,2 g/L de biomasa en reactores *batch* variando la concentración de SQP entre 52 y 312 g/L y en cultivos *fed-batch* de cinco ciclos obtuvo 8,26 g/L de biomasa, con rendimientos $Y_{X/S}$ inferiores a los 0,16 g_B/g_S con distintas cepas de *K. marxianus*. Ferrari et al. (2001) evaluaron la producción de *S. cerevisiae* utilizando un medio combinado melaza/SQ alcanzando un rendimiento de biomasa de 0,45 g_B/g_S. En general, de acuerdo a los resultados reportados, vemos que la producción de biomasa de levaduras a partir de SQ como sustrato se encuentra en un rango de 5 a 12 g/L y rendimientos entre 0,16 g_B/g_S a 0,86 g_B/g_S (Anvari & Khayati, 2011; Cristiani-Urbina et al., 2000; Farkas et al., 2019; Galvão de Souza Júnior et al., 2001; Oliveira et al., 2018; Ozmihci & Kargi, 2007a, 2007b, 2007c).

1.2 Optimización de un medio de cultivo basado en mosto de manzana

En esta Tesis se evaluó por primera vez al mosto de manzana (MM) como base para un medio de cultivo para el crecimiento de *V. victoriae*, empleando condiciones reportadas en bibliografía sobre el crecimiento de las levaduras en general y en trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio (Gramisci, 2019). Se evaluó mosto de manzana, MnSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, KH₂PO₄, urea y biotina en siete combinaciones distintas. Se seleccionó una condición (MM 50% v/v, urea 1,4 g/L y biotina 2,5 µg/L) por presentar

mayor producción de biomasa, mejor productividad y menor fase *lag*. Este medio de cultivo económico se empleó para escalar a nivel de reactor. Los resultados obtenidos muestran una mejoría en todos los parámetros cinéticos y de producción de biomasa cuando se comparan con la producción a nivel de frascos (Tabla 31). Al momento de determinar la concentración de células viables, estas alcanzan un valor de $9 \times 10^9 \pm 2,83 \times 10^8$ UFC/m (Tabla 32). Estos valores de células viables son superiores a los obtenidos en medios basados en SQP, que oscilaron en valores de $6,6 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$ UFC/mL (Tabla 8).

Luego de evaluar que *V. victoriae* era capaz de crecer en MM tanto a nivel de frascos como de reactor, se llevó a cabo una optimización del medio de cultivo realizando un DCC con puntos estrellas con cuatro factores (MM, KH_2PO_4 , urea, biotina). La superficie de respuesta obtenida a partir de los resultados y del análisis estadístico demostró que no existe ningún máximo absoluto en el espacio experimental seleccionado, sin embargo, se puede observar que concentraciones de MM mayores al 30% v/v y de KH_2PO_4 mayores a 7 g/L permitirían obtener mayores concentraciones de biomasa (Figura 18, A). Para encontrar el punto óptimo se realizó un segundo DCC con puntos estrellas para desplazarse de la región actual en la mejor dirección, en este caso la biotina no fue tenida en cuenta ya que resulta un insumo costoso y la concentración de urea se mantuvo fija en todos los ensayos en 2 g/L. La urea es un insumo económico ampliamente seleccionada como fuente de nitrógeno que permite obtener buenos rendimientos (Crueger et al., 1989; Reed & Nagodawithana, 1990). Luego del análisis, se determinó que la condición que maximiza la producción de biomasa corresponde a: MM, 44% v/v; KH_2PO_4 , 7,3 g/L y urea, 2 g/L. Para la validación del modelo, se llevaron a cabo una nueva serie de experimentos con el medio optimizado, se calcularon los índices de validación (A_f y B_f) que fue de 1,12 para ambos casos, observándose un buen comportamiento y reproducibilidad del modelo.

Cuando se compara la producción de biomasa a escala reactor, se observa que la concentración de biomasa es mayor cuando la levadura crece en el medio de cultivo no optimizado, sin embargo, esta diferencia es de solamente 2,87 g/L (Tabla 32 y 38). Analizando el resto de los parámetros cinéticos y de producción de biomasa del medio de cultivo optimizado con el no optimizado, se observa que el tiempo de cultivo es de aproximadamente 20 horas menor, hay un aumento en el rendimiento ($Y_{X/S}$), en la productividad volumétrica (P_v) y en la velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$).

1.2.1 Comparación de escalas

Se realizaron dos configuraciones de reactor para producir biomasa (reactor *batch* y semicontinuo, RSC) a escala laboratorio. La Tabla 50 se desprende de la Tabla 49 ya que se obtiene un valor de $Y_{X/S}$ y $\mu_{\text{máx}}$ en cada etapa del cultivo. La producción de biomasa en reactor RSC alcanzó mejores resultados que el reactor *batch* (Tabla 49) en cuanto a producción de biomasa (peso seco y UFC/mL). Se comprobó que esta configuración de reactor permite alcanzar mayores valores disminuyendo los tiempos de producción en comparación con un reactor *batch* convencional, así como también menos tiempo para la preparación del inóculo, limpieza y esterilización (Tabla 49).

Tabla 49. Comparación de producción de biomasa a escala laboratorio.

	Reactor <i>batch</i> ¹	Reactor semicontinuo ²
Volumen (L)	12	27
t cultivo (h)	59 ± 7,90	134,2 ± 7
DO _{máx}	36,30 ± 3	45,6 ± 1,50
Biomasa total (g)	123,40 ± 1,60	299,2 ± 2,30
Biomasa (g/L)	10,30 ± 0,14	11,10 ± 0,10
UFC total	1,29x10 ¹³ ± 1,1x10 ¹³	2x10 ¹⁹ ± 1,9x10 ¹⁹
UFC/mL	1,10x10 ⁹ ± 8,1x10 ⁸	4x10 ¹⁵ ± 1,4x10 ¹⁵
P _v (g/L.h)	0,18 ± 0,03	0,083 ± 0,007
Consumo azúcar (g/L)	19,70 ± 2,70	48,20 ± 3,78
Consumo amonio (g/L)	0,29 ± 0,13	1,12 ± 0,05
Y _{X/S}	0,53 ± 0,06	.*
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,07 ± 0,01	.*
k _{La} (h ⁻¹)	30,72	30,72

*Ver datos en Tabla 48. 1: promedio de tres RB en medio optimizado con MM. 2: promedio de dos RSC en medio optimizado con MM.

Tabla 50. Rendimientos ($Y_{X/S}$) y $\mu_{\text{máx}}$ en cada una de las etapas *batch* dentro de los reactores semicontinuos.

RB1	Y _{X/S}	0,80 ± 0,01	μ _{máx1}	0,07 ± 0,001
RB2	Y _{X/S}	0,59 ± 0,06	μ _{máx2}	0,03 ± 0,003
RB3	Y _{X/S}	0,28 ± 0,04	μ _{máx3}	0,03 ± 0,002
RB4	Y _{X/S}	0,51 ± 0,03	μ _{máx4}	0,03

Por otro lado, comparando los resultados obtenidos en *batch* de 12 L utilizando los dos medios de cultivo optimizados (Tabla 47 y 49), los cultivos realizados con el medio optimizado con MM, son relativamente más cortos que los cultivos con SQP, ya que demoran entre 11 y 16 horas menos en alcanzar la fase estacionaria, mientras que no existen grandes diferencias en el resto de los parámetros analizados. Por otro lado, los reactores con SQP presentan mayores desvíos en sus parámetros de crecimiento a diferencia de los reactores con MM, que resultaron ser más reproducibles. En cuanto a la producción en RSC, los parámetros analizados son superiores para los reactores en los que se utilizó MM como medio de cultivo (Tabla 49), presentaron mayor producción de biomasa (UFC/mL, peso seco (g/L), absorbancia) y mayores consumos de fuente de carbono y nitrógeno que los RSC realizados con SQ (Tabla 47). La mayor producción de biomasa en el reactor con MM podría deberse al valor de k_{La} ($30,72 \text{ h}^{-1}$), el cual es mayor en comparación con el obtenido en SQP ($23,7 \text{ h}^{-1}$). Por otro lado, existen varios factores que pueden afectar la transferencia de oxígeno, y en consecuencia la producción de biomasa, uno de ellos es la adición de agentes antiespumantes.

Estos productos son adicionados cuando existe formación de espuma en los cultivos aerobios, generalmente cuando se utilizan medios de cultivos ricos en proteínas, como es el caso de SQP (Doran, 2013). La formación de espuma es un inconveniente, sin embargo, la adición de antiespumantes disminuye en gran medida la transferencia de oxígeno afectando directamente el crecimiento de la levadura (Doran, 2013). Por otro lado, la presencia de solutos como sales, ácidos y azúcares que normalmente se requieren en los medios de cultivo, afectan a la solubilidad del oxígeno en agua, modificando también el valor de k_{La} dependiendo del medio de cultivo utilizado (Doran, 2013). En cuanto a rendimientos ($Y_{X/S}$) existen diferencias en los valores obtenidos en cada una de las etapas *batch* dentro de cada RSC (con medio MM), en especial en RB1, en cuanto a las velocidades de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) no presentan diferencias entre los dos medios optimizados. Si comparamos en líneas generales la producción de biomasa, se podría considerar como mejor medio de cultivo el basado en MM para llevar a cabo la producción de biomasa de *V. victoriae* tanto en reactor *batch* como en RSC a escala de laboratorio. Sería interesante en un futuro realizar el escalado a 100 L con el medio optimizado MM.

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.

En esta Tesis se utilizaron dos metodologías para concentrar el ACB: centrifugación y filtración tangencial. Independientemente de la técnica utilizada, se observó una pérdida en la viabilidad finalizado el proceso. En el caso de la biomasa crecida en medio optimizado con SQP en reactores *batch*, los porcentajes de pérdida de viabilidad varían entre 20% y 90%; en cambio en RSC, cuando la biomasa se produce con el mismo medio, los porcentajes de pérdida son mucho mayores (90-99%), disminuyendo en un orden de magnitud la concentración celular independientemente del sistema de concentración utilizado. Para la biomasa crecida en medio optimizado con MM en reactores *batch*, la pérdida de viabilidad es mucho menor, entre 11% y 18%, en comparación con la biomasa producida en medio con SQP, sin embargo, cuando la biomasa es producida en RSC, los valores obtenidos son similares a SQP, con pérdida de viabilidad entre 95% y 99%. Las pérdidas de viabilidad observadas durante el proceso *downstream* están relacionadas con la exposición de las levaduras a diversos factores estresantes. Entre estos factores se incluyen los cambios de temperatura generados durante el proceso y la eliminación de nutrientes del medio residual durante el lavado de la biomasa. Estos factores acentúan los procesos de envejecimiento, lo cual puede afectar negativamente la viabilidad y eficacia de las levaduras (Macarisin et al., 2010; Sui et al., 2015). Esto puede afectar negativamente a las propiedades del ACB, disminuyendo su capacidad antagonista o de colonización sobre la superficie de la fruta tratada. Sin embargo, no se han evaluado en bibliografía los efectos que tienen estas tecnologías aplicadas al procesamiento posterior a pequeña y gran escala de agentes de biocontrol (Wisniewski et al., 2010).

3 Formulación del ACB

Los agentes de biocontrol deben producirse en grandes cantidades, pueden prepararse tanto como productos secos o líquidos, deben conservar su eficacia de biocontrol y una máxima vida útil. Por lo tanto, su formulación debe cumplir ciertos criterios para tener éxito comercial. Entre ellos se incluyen: (a) mejora y aumento de la eficacia del biocontrol

a escala comercial; (b) facilitar su distribución, almacenamiento, manipulación y uso del producto (c) estabilizar y proteger al microorganismo de factores ambientales nocivos; (d) ampliación de la vida útil de los productos en al menos seis meses y (e) ser compatible con los demás métodos y equipos de aplicación existentes (Melin et al., 2006; Patiño-Vera et al., 2005; Teixidó et al., 2022).

Entre las metodologías posibles, se eligió la liofilización para formular la biomasa crecida en el medio de cultivo optimizado con SQP. Existen varios protectores químicos para preservar la viabilidad durante la liofilización, su selección varía con la especie de levadura, la concentración inicial de células viables sometidas al proceso, la temperatura de congelación y el tiempo de rehidratación, así como también la solución que se utilice para la rehidratación (Navarta et al., 2011; Gamero-Sandemetro et al., 2014). En esta Tesis, para la biomasa crecida en frascos con el medio de cultivo optimizado con SQP se evaluó, previo a la liofilización, una temperatura de congelación de -80°C , con el agregado de GMS como crioprotector, en combinación con SQP o LDP (30% p/v) como protectivos. Para las dos combinaciones de protectivos, la viabilidad luego de la liofilización disminuye en 3 órdenes de magnitud, obteniendo un 0,1% de viabilidad cuando GMS se combina con SQP y un 0,08% de viabilidad cuando se combina con LDP. De la misma manera, durante un período de almacenamiento de 90 días, el GMS en combinación con SQP mostró una supervivencia de la levadura como LSA significativamente mejor en comparación con su combinación con LDP, aproximadamente el 68%. A partir de estas pruebas en pequeño volumen, la biomasa producida en reactor se liofilizó en la condición seleccionada conservando una viabilidad luego de 90 días de almacenamiento en el rango de 49-69% (Tabla 17, 20 y 27).

Por otro lado, para la liofilización de *V. victoriae* crecida en medio optimizado con MM en frascos, se evaluaron tres crioprotectores en combinación con dos agentes protectivos y dos temperaturas de congelación. Durante el período de almacenamiento (255 días) de la biomasa liofilizada, el GMS resulta ser el mejor crioprotector alcanzando una mayor viabilidad cuando la biomasa es previamente congelada a una temperatura de -80°C . Cuando se empleó LDP como agente protector y GMS, la viabilidad fue mayor (30,6%) que cuando se utiliza SQP y GMS (12,1%). A partir de estas pruebas en pequeño volumen, la biomasa producida en los diferentes reactores se liofilizó, confirmando que la LDP es el

mejor agente protector, conservando entre el 50-60% de viabilidad luego de 60 días de almacenamiento (Tabla 40 y 41). El RB1 presentó una escasa viabilidad luego de la liofilización (Tabla 39), esto podría deberse a que el proceso *downstream* se llevó a cabo en 15 días (puesta a punto del equipo de ultrafiltración), mientras que para RB2 y RB3 solo tomó 5 días. Por otro lado, se puede observar que RB1 presentó una similar producción de biomasa que RB2 y RB3, pero una cantidad de células viables un orden de magnitud menor, dato que concuerda con una menor viabilidad luego de la liofilización y durante el almacenamiento (Tabla 38).

Los valores de viabilidad en las condiciones seleccionada en este trabajo, fueron más altos que los reportados en bibliografía por otros autores. Cabrefiga et al., 2014, obtuvieron luego de 12 meses de conservación a 20°C una viabilidad del 3,3% para *Pseudomonas fluorescens* almacenada a 4°C, utilizando lactosa como crioprotector. Melin et al., 2007, obtuvieron luego de 3 meses de conservación a 20°C porcentajes de viabilidad entre 12% y 45% para *Pichia anomala* utilizando trehalosa y sacarosa al 5% como crioprotectores. Navarta et al. (2014), evaluaron la viabilidad de *Cryptococcus laurentii* almacenada a 4°C durante 90 días, evaluando para la liofilización como crioprotectores: LDP (10% p/p) o en combinación con trehalosa, fructosa y sacarosa (10% p/p). Obtuvo la menor viabilidad con LDP sola (18%), mientras que la mayor viabilidad se alcanzó con LDP + sacarosa (52%). Por último, trabajos realizados con *C. sake* (Abadias et al., 2001), evaluaron el efecto de la liofilización sobre la viabilidad de la levadura inmediatamente después del proceso utilizando diversas combinaciones de agente protector + crioprotector, sin tener en cuenta la influencia en la viabilidad de la misma durante el tiempo de conservación. Utilizando LDP (10% p/p), GMS (10% p/p), sorbitol (10% p/p), entre otros, alcanzado porcentajes de viabilidad de 22%, 19,8% y 13% respectivamente, para el ACB *Candida sake*. También evaluó LDP en combinación con los distintos crioprotectores evaluados, reportando una mejoría en los porcentajes de viabilidad entre el 25% y 40%.

Por otro lado, se evaluó el secado spray como metodología para obtener la levadura en formulación seca. Esta metodología se aplicó a la biomasa obtenida en el proceso de escalado en el reactor de 140 L. Se evaluaron dos condiciones de secado *spray*, detalladas en el apartado 6.2.2. La viabilidad de la levadura disminuyó de 10^{12} a 10^5 UFC/mL con cualquiera de las condiciones evaluadas al momento de secado. Durante el período de

almacenamiento, se alcanzó una viabilidad del 10,7% con la condición C2 y un 2,7% viabilidad con la condición C1. Como se puede apreciar, la viabilidad fue muy baja, probablemente debido a que la levadura no pudo sobrevivir a las temperaturas de trabajo, ya que *V. victoriae* no es capaz de sobrevivir más allá de los 25°C en medios de cultivos. Los ACB capaces de producir endosporas termorresistentes son los más adecuados para ser formulados con esta técnica, principalmente bacterias como es el caso de *B. amyloliquefaciens* CPA-8 y *Paenibacillus polymyxa* (Liu et al., 2014; Yáñez-Mendizábal et al., 2012). En cuanto a las levaduras, otros autores obtuvieron porcentajes de viabilidad alrededor del 15% para *C. sake* (Cañamás et al. 2008) utilizando LDP (10% p/p), sin embargo, esta pérdida de viabilidad resulta poco rentable para su aplicación como ACB. Por otro lado, Liu et al., 2014 obtuvieron para *Paenibacillus polymyxa* una viabilidad de 83,5–86,6% luego del secado spray. Para *S. cerevisiae*, Vorländer et al., 2023 obtuvieron una viabilidad del 62% utilizando una combinación de trehalosa y LDP; mientras que Aponte et al., 2016 alcanzaron una viabilidad de 15,9% combinando almidón y maltosa.

Los ACB en formulaciones secas tienen un tiempo de almacenamiento más largo, un riesgo de contaminación mínimo y son más fáciles de almacenar, enviar y distribuir (Li y Tian, 2006). Sin embargo, una de las desventajas de las formulaciones secas es la elevada mortalidad celular debida a los procesos de deshidratación y rehidratación. Sería necesario realizar mayores estudios para mejorar la formulación de *V. victoriae*, evaluando otros protectores para el secado *spray* o incluso otros métodos de secado como el lecho fluido para aumentar la viabilidad de las células para un posible formulado comercial como ACB.

Dadas las dificultades y costos de los procesos de secado, la formulación líquida de las levaduras es una alternativa posible. Este tipo de formulación no requiere ningún proceso de secado o equipos especializados en la fabricación y su desarrollo es menos costoso (Dukare et al., 2019), generalmente requiere la manipulación de grandes volúmenes con protección contra la contaminación, como también para su distribución y almacenamiento se requieren bajas temperaturas de conservación. Esto genera un inconveniente en cuanto a su uso práctico, con una vida comercial de pocos meses y costos elevados de almacenamiento (Melin et al., 2011; Teixidó et al., 2022). De acuerdo a la bibliografía, muchos autores evalúan diversos protectores (trehalosa, lactosa, almidón, entre otros) en distintas concentraciones y temperaturas de almacenamiento, alcanzando valores

de viabilidad entre 53-90% (Liu et al., 2009; Melin et al., 2006). Abadias et al. (2003) obtuvieron mejores resultados que la formulación seca cuando *C. sake* se conservó en una solución isotónica de trehalosa, con una viabilidad celular del 77% luego de 7 meses de almacenamiento a 4°C. En esta Tesis se valuó el almacenamiento de la biomasa fresca crecida en el medio con SQP, se almacenó a 4°C y -20°C, utilizando como crioprotector GMS, sorbitol o glicerol. Con GMS, a -20°C luego de 30 días de conservación se obtuvo la mayor viabilidad (37,9%), mientras que a 4°C la biomasa mostró valores de viabilidad inferiores al 10%. La formulación líquida de este ACB es un aspecto que se podría mejorar a futuro, optimizando diferentes protectores en distintas concentraciones que permitan alcanzar los valores reportados en bibliografía.

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

La producción de biomasa a gran escala es un requisito indispensable cuando se quiere apuntar en un futuro a la aplicación de los 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 estos ensayos se realizó la producción de *V. victoriae* a escala laboratorio y piloto, a diferentes volúmenes finales de cultivo: de 12, 27 y 100 litros, con diferentes medios de cultivo, lo que implica un diferente acondicionamiento fisiológico de las levaduras.

La biomasa de *V. victoriae* obtenida en los reactores fue evaluada a escala semicomercial en diferentes temporadas. 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). Por otro lado, se aplicó la biomasa de la levadura crecida en los dos medios de cultivo optimizados en las diferentes configuraciones de reactores (*batch* y RSC), en dos escalas (laboratorio y piloto), tanto fresca como liofilizada.

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 50% y en algunos casos alcanzado el 100% de control. En algunas temporadas, se obtuvieron menores porcentajes de control de las enfermedades postcosecha. Estas variaciones podrían deberse a varios factores como: el proceso de producción de la biomasa de levaduras, el método de aplicación, el estado fisiológico de la fruta, la presencia de infecciones latentes o incluso la combinación de levaduras con fungicidas convencionales (Basso et al., 2022; Droby, 2006; Sanzani et al., 2009). Sepúlveda et al. (2022) reportaron con *V. victoriae* EPL4.5 y EPL29.5, un 41,7% y 62,5% de control respectivamente sobre la enfermedad causada por *Phlyctema vagabunda* en manzanas. Marsico et al. (2021) reportaron un porcentaje de control del 100% de 4 levaduras nativas en heridas de uvas de mesa. Resultados similares fueron reportados también con *Candida sake* en manzanas y heridas de peras en ensayos a escala semicomercial (Torres et al., 2006; Usall et al., 2001).

En términos generales, los ensayos mostraron que los porcentajes de incidencia de las podredumbres fueron mayores en peras que en manzanas, sin embargo, los porcentajes de control fueron superiores en peras. Esto podría explicarse, ya que la cepa *V. victoriae* NPCC 1263 fue aislada específicamente de la superficie de peras conservadas en cámara frigorífica y seleccionada como levadura antagonista para el control biológico de las dos principales enfermedades postcosecha en esta fruta, *B. cinerea* y *P. expansum* (Lutz et al., 2012, 2015). Por otro lado, esto coincide con otras investigaciones (Gramisci, 2019; Lutz et al., 2017; Manso & Nunes, 2011; Torres et al., 2006) que evidencian que varietales de peras son más susceptibles que los varietales de manzana a las enfermedades causadas por los fitopatógenos.

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, se alcanzaron buenos porcentajes de control en manzanas. Cuando la levadura creció en medio de cultivo con SQP, aplicada tanto fresca como liofilizada-rehidratada se alcanzaron los mayores porcentajes de control sobre *P. expansum* (63-68%). Del mismo modo, cuando la levadura aplicada creció en medio de cultivo con MM, los mejores porcentajes de control se alcanzaron sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. (82-100%). La levadura fresca, crecida en ambos medios de cultivo logró controlar entre el 29-57% a *B. cinerea*.

Con respecto a 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 en todas las temporadas 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 poscosecha, por otro lado, Packham's Triumph en general comienza a producir etileno en conservación antes que Beurré D'Anjou (Calvo et al., 2022). Sin embargo, como se mencionó anteriormente los porcentajes de control variaron de una temporada a la otra sobre ambos varietales.

Similar a lo que ocurre en manzanas, la levadura liofilizada no logra controlar en todas las temporadas la enfermedad causada por *B. cinerea*, alcanzando un máximo de 36% de control sobre Packham's Triumph. Considerando que el ACB fue aislado por su capacidad biocontroladora sobre *B. cinerea* y *P. expansum*, es importante destacar que el control sobre *Alternaria-Cladosporium* spp. resultó ser muy bueno, con porcentajes que alcanzaron el 86% y el 100% en algunos casos. Existen pocos estudios sobre este patógeno 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).

En cuanto al medio utilizado para producir el ACB, el porcentaje de biocontrol es mayor cuando las levaduras crecen en el medio de cultivo optimizado con SQP, sin embargo, las diferencias no son significativas cuando se comparan con las levaduras crecidas en el medio de cultivo optimizado con MM.

Por otro lado, cuando se evaluó la aplicación de la levadura sola o en combinación con cloruro de calcio, se observó que el agregado de esta sal mejora la capacidad antagonista de *V. victoriae* (efecto sinérgico), aumentando los porcentajes de control obtenidos frente a los patógenos estudiados sobre los dos varietales de peras ya que activan el sistema de defensa natural de las frutas (Meng & Tian, 2009; Palou et al., 2015). Con CaCl_2 los porcentajes de control se mantuvieron entre 67-93% y sin esta sal entre 58-73%, sobre el varietal Beurré D'Anjou. Para el varietal Packham's Triumph, el porcentaje de control de la levadura combinada con CaCl_2 fue de 39-58%, mientras que la levadura sin esta sal solo logró controlar a *Alternaria-Cladosporium* spp. en un 15%.

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 este factor sobre los ACB. Los resultados obtenidos en esta tesis, muestran que el sistema de aplicación convencional utilizado en el ensayo de la primera temporada redujo significativamente el número total de células en 2 órdenes de magnitud con respecto a la cantidad inicial contenida en el tanque de aplicación. Posiblemente la presión impulsora, los esfuerzos de corte y el paso a través de las boquillas generan la ruptura de las células reduciendo su número y viabilidad. Lutz (2015) en ensayos similares reportó que la viabilidad de las levaduras disminuyó entre 2 y 3 órdenes de magnitud, mientras que Gramisci (2019) reportó que la cantidad de levaduras viables disminuyó en un orden de magnitud al pasar por las toberas. Frente a esta pérdida de viabilidad, en temporadas posteriores, el sistema de aplicación se cambió por un tubo de PVC perforado (Figura 22), este sistema disminuye la presión ejercida permitiendo que las células pasen a través de los orificios gracias a la fuerza de gravedad. Con este sistema no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las levaduras cuando se compara con la viabilidad de las levaduras en el tanque de aplicación.

Cuando se aplican levaduras liofilizadas (rehidratadas previamente), se observa una disminución de 45-55% en la viabilidad al pasar por el sistema de aplicación. Este hecho podría explicar la razón por la cual los porcentajes de control son más bajos en comparación con la levadura fresca. La disminución en la cantidad de levaduras podría deberse a la formación de cúmulos de levadura que dificultan el paso, tapando los orificios de salida. En un futuro podrían ajustarse distintos factores, como el proceso y el tiempo de rehidratación de la biomasa liofilizada, la humectabilidad y desintegración en agua en un tiempo determinado o incluso el uso de una solución específica para la rehidratación (Gamero-Sandemetrio et al., 2014; Navarta et al., 2011; Torres Alarcón, 2009). Estudiar y analizar estas variables permitiría evitar esta pérdida de levaduras viables a partir de las levaduras secas.

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 & 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, 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 esta Tesis fue necesario evaluar la capacidad de colonización de este antagonista de acuerdo a la condición de cultivo empleada para la producción de biomasa, para evaluar si influiría en el acondicionamiento fisiológico de la levadura para emplearla como ACB. Los resultados de los ensayos *in situ* 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.

Cuando la biomasa es aplicada liofilizada-rehidratada, crecida en cualquiera de los medios de cultivo, es capaz de colonizar en mayor medida la superficie de la fruta en comparación con la biomasa fresca (Figuras 31 y 42). Por otro lado, cuando se compara la población final de levaduras sobre la superficie de la fruta al final del ensayo, sobre los varietales de pera ($2,35 \times 10^3 \pm 1,32 \times 10^3$ UFC/cm²) la concentración resulta ser un orden de magnitud mayor a la lograda sobre el varietal de manzana ($3,97 \times 10^2 \pm 1,26 \times 10^2$ UFC/cm²). Con respecto al medio de cultivo, *V. victoriae* crecida en la condición SQP logra 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 (SQ: $4,29 \times 10^2$ UFC/cm² a $3,54 \times 10^3$ UFC/cm² y MM: $1,56 \times 10^2$ UFC/cm² a $1,83 \times 10^3$ UFC/cm²) a 180 días de conservación en frío. Estos resultados coinciden con los valores obtenidos en ensayos *in situ* 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 cultivares 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 esta tesis 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.

En el ensayo realizado en la línea de empaque de producción convencional, los tratamientos no lograron controlar la enfermedad causada por *P. expansum*, pero si alcanzaron porcentajes de control superiores al 47% para las enfermedades causadas por *B. cinerea* y *Alternaria-Cladosporium* spp. a los 180 días de almacenamiento. Sin embargo, cuando se evalúa la capacidad de colonización de las levaduras sobre la superficie de la fruta, se observa que la concentración de células disminuye a lo largo del tiempo, alcanzando una baja concentración de UFC/cm² tanto en pera como en manzana. Esto indica que el uso de fungicidas químicos en dosis comerciales inhibe el crecimiento de la levadura en superficie, por lo que los porcentajes de control alcanzados podrían ser debido al efecto de estos fungicidas. Existen reportes que indican que el uso de un ACB en combinación con un fungicida químico en dosis bajas puede mejorar la eficacia de biocontrol, similar al uso del fungicida solo en dosis comerciales, lo que se considera un método eficaz para reducir el uso de fungicidas (Dukare et al., 2019; Qin & Tian, 2004; Zhang et al., 2020). Pero esta metodología tiene el riesgo de elevar el porcentaje de cepas de fitopatógenos resistentes a los fungicidas químicos (Buck, 2004; Lima et al., 2011; Zhang et al., 2020).

V. victoriae fue reportada como agente de control biológico por primera vez en este grupo de investigación (Lutz et al., 2012). Hasta la fecha, se han documentado pocos resultados sobre esta levadura como ACB (Gramisci, 2019; López, 2021; Lutz et al., 2015, 2020; Nian et al., 2023; Sepúlveda et al., 2022). Los estudios sobre la efectividad antagonista de este ACB, manejando grandes cantidades de fruta (aproximadamente 400 kg por tratamiento) en ensayos realizados en galpones de empaque siguiendo el manejo tradicional de la fruta postcosecha, son únicos en la bibliografía científica. Los resultados obtenidos en esta Tesis, demuestran que esta levadura es capaz de controlar las enfermedades principales en los dos varietales de peras y manzana en condiciones reales de

conservación en empaque comercial, considerando la presión natural de los patógenos presentes. Finalmente, el uso de este ACB es una herramienta biológica con gran potencial de aplicación para controlar las enfermedades fúngicas en la producción de fruta orgánica de la zona, siendo respetuosos con el medio ambiente y sin generar efectos secundarios. Permitiendo reducir o sustituir el uso de fungicidas químicos debido a su impacto en la salud de los consumidores y el medio ambiente.

CONCLUSIONES



- El uso de residuos agroindustriales permite diseñar medios de cultivo de bajo costo con los cuales se pueden obtener grandes cantidades de biomasa de la levadura. El MM presenta ventajas con respecto al SQP, dado que es un sustrato fácilmente accesible a nivel regional.
- ♣ Se optimizaron mediante diseños estadísticos experimentales dos medios de cultivo para aumentar la producción de la biomasa. El primero basado en el residuo de la industria láctea: constituido por SQP, 80g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,2 g/L; KH₂PO₄, 10 g/L. El segundo, basado en el residuo de la industria sidrera, compuesto por MM ,44% v/v; KH₂PO₄, 7,3 g/L y urea, 2 g/L.
- La levadura es capaz de crecer en bioreactor a escala laboratorio en medio optimizado, obteniendo $1,7 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^9$ UFC/mL con SQP y $1,1 \times 10^9 \pm 8,1 \times 10^8$ UFC/mL con MM para ser aplicadas en ensayos a escala semicomercial sobre frutas postcosecha.
- ♣ La producción de biomasa en RSC permite obtener concentraciones de biomasa mucho mayores, entre $3,6 \times 10^{12}$ con SQP y 4×10^{15} con MM, en comparación con las obtenidas en los cultivos *batch*, además presenta la ventaja que reduce los tiempos y costos que conlleva producir más de un cultivo *batch*. Los mejores resultados en RSC se obtienen cuando la levadura crece en medio optimizado con MM.
- El escalado de la biomasa a 100 L en reactor *batch* utilizando SQP permite obtener mejores resultados cuando se compara con la producción en reactor a escala laboratorio: duplica el peso seco por litro, aumenta un orden de magnitud las células viables y duplica la productividad volumétrica.
- ♣ El proceso *dowstream* afecta la viabilidad de las levaduras en mayor medida cuando crecen en medio optimizado con SQP que en MM en reactor *batch*. Cuando crecen en RSC, la pérdida de viabilidad es mucho mayor en comparación con el reactor *batch*, independientemente del medio de cultivo utilizado.
- El secado *spray* no es una metodología adecuada para obtener levadura seca activa de este ACB ya que no puede sobrevivir a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso.
- ♣ El secado por liofilización es una metodología adecuada para obtener levadura seca activa de este ACB con el agregado de GMS 1% p/v como crioprotector y con LDP/SQP 30% p/v como agentes protectivos, ya que disminuyen las pérdidas de viabilidad. Sin

embargo, durante este procedimiento la biomasa reduce su viabilidad en al menos dos órdenes de magnitud. Luego de 90 días de almacenamiento de la biomasa liofilizada, se alcanzan porcentajes de viabilidad entre 34-68%.

- 🍏 El cloruro de calcio actúa como un potenciador del biocontrol, ya que el agregado de esta sal mejora la capacidad antagonista de *V. victoriae* (efecto sinérgico), aumentando los porcentajes de control obtenidos frente a *B. cinerea*, *P. expansum* y *Alternaria-Cladosporium* spp. en ensayos a escala semicomercial.
- 🍏 La levadura obtenida en las dos escalas de producción (laboratorio y piloto) aplicada tanto fresca como seca-rehidratada, logra controlar las enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos en ensayos a escala semicomercial en un varietal de manzana y en dos de pera.
- 🍏 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 la formulación del ACB, ya sea en presentación líquida o seca.
- 🍏 Sería interesante en un futuro llevar a cabo el escalado a 100 L de la producción de biomasa de ACB con el medio optimizado basado en mosto de manzana (MM) y evaluar su eficacia en ensayos a escala semicomercial.
- 🍏 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 la transferencia, sería necesario evaluar la factibilidad técnica, económica y comercial del producto.

BIBLIOGRAFÍA



- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Viñas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 173-182. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00513-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00513-4)
- Adaskaveg, J. E., & Förster, H. (2010). New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies in the United States. En D. Prusky & M. L. Gullino (Eds.), *Postharvest Pathology* (pp. 107-117). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8930-5_8
- Agirman, B., & Erten, H. (2020). Biocontrol ability and action mechanisms of *Aureobasidium pullulans* GE17 and *Meyerozyma guilliermondii* KL3 against *Penicillium digitatum* aguDSM2750 and *Penicillium expansum* DSM62841 causing postharvest diseases. *Yeast*, 37(9-10), 437-448. <https://doi.org/10.1002/yea.3501>
- Aguilar, L., & 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., & Carrillo, L. (2004). Levaduras inhibidoras de *Penicillium*. *Revista argentina de microbiología*, 36(4), 182-186.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Altisent, R., & 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>
- Anvari, M., & Khayati, G. (2011). Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and Nutritional profile. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(2), 122-126.
- Anvari, M., Khayati, G., & 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>
- Aouidi, F., Khelifi, E., Asses, N., Ayed, L., & Hamdi, M. (2010). Use of cheese whey to enhance *Geotrichum candidum* biomass production in olive mill wastewater. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(8), 877-882. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0752-3>
- Aponte, M., Troianiello, G. D., Di Capua, M., Romano, R., & Blaiotta, G. (2016). Impact of different spray-drying conditions on the viability of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1956-5>
- Armando, M. R., Galvagno, M. A., Dogi, C. A., Cerrutti, P., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). Statistical optimization of culture conditions for biomass production of probiotic gut-borne *Saccharomyces cerevisiae* strain able to reduce fumonisin B₁. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1338-1346. <https://doi.org/10.1111/jam.12144>
- Babic, L., Matic-Kekic, S., Dedovic, N., Babic, M., & 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>
- Baker, K., & Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman and Company. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19741622425>

- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A. E., & Taguchi, H. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 9(4), 533-544. <https://doi.org/10.1002/bit.260090408>
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables* (1.^a ed.).
- 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
- Basso, C., Sosa, M. C., & Lutz, M. C. (2022). Infecciones tempranas de *Botrytis cinerea* y *Alternaria* spp. Y su relación con pudriciones de postcosecha en pera D'Anjou. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 38(3), 234-240. <https://doi.org/10.29393/CHJAA38-30JUBF10030>
- Bautista-Baños, S. (2006). *El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: Uso de microorganismos antagonicos*. 8(1), 1-6.
- Bosso, A., Bosso Tomal, A. A., Caldeirão, L., Da Silva, J. B., & 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>
- Box, G. E. P., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters: Design, innovation, and discovery* (2nd ed). Wiley-Interscience.
- Bravo, S. M. E., Morales, M., del Mónaco, S. M., & 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>
- Buck, J. W. (2004). Combinations of fungicides with Phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. *Phytopathology*®, 94(2), 196-202. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.196>
- Buzzini, P., & 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
- Cabrefiga, J., Francés, J., Montesinos, E., & Bonaterra, A. (2014). Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant. *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), 1122-1131. <https://doi.org/10.1111/jam.12582>
- Calvo, G., & Candan, A. P. (2018). *Tecnología de poscosecha de fruta de pepita* (p. 45). INTA. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/4201>
- Cao, S., Yuan, Y., Hu, Z., & Zheng, Y. (2010). Combination of *Pichia membranifaciens* and ammonium molybdate for controlling blue mould caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 173-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.009>
- Capdevila, V., Vales, M. E., & 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 Castro, Tavares, Araújo, da Paz, & 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>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *The Science of the Total Environment*, 445-446, 385-396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Carvalho Pássaro, C. P., Nunes, C., & Palou, L. (2012). *Control de enfermedades de poscosecha*.
- Champagne, C. P., Gardner, N., & Doyon, G. (1989). Production of *Leuconostoc oenos* biomass under pH control. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10), 2488-2492. <https://doi.org/10.1128/aem.55.10.2488-2492.1989>
- Chand-Goyal, T., & Spotts, R. A. (1996). Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology*, 7(1), 51-64. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00031-3](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00031-3)
- Chand-Goyal, T., & 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>
- Código Alimentario Argentino*. (2023). https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/marco/CAA/Capitulo_08.htm
- Conway, W. S., Janisiewicz, W. J., Leverentz, B., Saftner, R. A., & Camp, M. J. (2007). Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture, and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 45(3), 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.005>
- Costa, E., Teixido, N., Usall, J., Atares, E., & Vinas, I. (2002). 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>
- Cristiani-Urbina, E., Netzahuatl-Muñoz, A. R., Manriquez-Rojas, F. J., Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N., & Galíndez-Mayer, J. (2000). Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochemistry*, 35(7), 649-657. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00116-8)
- Crueger, W., Crueger, A., & Padín, P. L. (1989). *Biotechnología: Manual de microbiología industrial* (3a ed) [Impresión]. Acribia.
- Csutak, O., Sarbu, I., & Vassu, T. (2012). Influence of sodium bicarbonate, calcium chloride and growth media on antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(2013), 79-86.
- da Cunha, T., Ferraz, L. P., Wehr, P. P., & Kupper, K. C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.019>
- Dal Bello, G., Mónaco, C., Rollan, M. C., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., Ronco, L., & Stocco, M. (2008). Biocontrol of Postharvest Grey Mould on Tomato

- by Yeasts: Biocontrol of 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., & 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>
- Di Masi, S., & Colodner, A. (2010). Control de enfermedades patológicas en frutas de pepita en poscosecha. *Fruticultura y diversificación.*, 51.
- Díaz, M. A., Pereyra, M. M., Santander, F. F. S., Perez, M. F., Córdoba, J. M., Alhussein, M., Karlovsky, P., & 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>
- Dictionnaire d'agroécologie.* (s.f.). Recuperado 2 de junio de 2023, de <https://dicoagroecologie.fr/en/homepage-english/>
- Dobra, A. C., & Rossini, M. (1993). Patógenos de postcosecha: Aspectos epidemiológicos, resistencia a fungicidas y su control. *Curso Internacional de Sanidad en Frutales de Pepita; General Roca, Río Negro, AR. 17-21 mayo 1993.*
- Doores, S., & Splittstoesser, D. F. (1983). The microbiology of apples and apple products. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 19(2), 133-149. <https://doi.org/10.1080/10408398309527372>
- Doran, P. M. (2013). *Bioprocess engineering principles* (2nd ed). Elsevier/Academic Press.
- Droby, S. (2006). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: difficulties and challenges. *Phytopathol. Pol.*, 39, 105-117.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M., & 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., & 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., & 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>
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498-1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M., & Wilson, C. (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>
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., & Wilson, C. L. (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest

- decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19(1), 103-110. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00076-4)
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. (2003). Control of postharvest decay of apple Fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology*, 93(3), 344-348. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.344>
- El-Ghaouth, A., Wilson, C., & 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: Diagnosis and Management* (pp. 511-535). https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_14
- Ernst, B. (2020). *Frutas de Argentina. Estudio comparativo 2008-09 vs. 2018-19*. <https://www.revistainternos.com.ar/v2/wp-content/uploads/2021/04/FRUTICULTURA-ARGENTINA-Estudio-Comparativo-2009vs.2019-2-COMPLETO-FDA.pdf>
- Ezzougari, R., Bahhou, J., Taoussi, M., Seddiqi Kallali, N., Aberkani, K., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2024). Yeast warriors: Exploring the potential of yeasts for sustainable citrus post-harvest disease management. *Agronomy*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agronomy14020288>
- Farkas, C., Rezessy-Szabó, J. M., Gupta, V. K., Bujna, E., Pham, T. M., Pásztor-Huszár, K., Friedrich, L., Bhat, R., Thakur, V. K., & Nguyen, Q. D. (2019). Batch and fed-batch ethanol fermentation of cheese-whey powder with mixed cultures of different yeasts. *Energies*, 12(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/en12234495>
- Ferrari, M. D., Bianco, R., Froche, C., & Loperena, M. L. (2001). *Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures*. 23, 1-4. <https://doi.org/10.1023/A:1026778503871>
- Ferré, J., & Rius, F. X. (2001). *INTRODUCCIÓN AL DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS*.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejía, M. P., Tilocca, B., & 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>
- Galvão de Souza Júnior, C., MacDonald Ledhingham, W., & Antônio de Moraes Junior, M. (2001). Utilisation of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett*, 23, 1413-1416. <https://doi.org/10.1023/A:1011617914709>
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., & Matallana, E. (2014). Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnology Journal*, 9(8), 1055-1064. <https://doi.org/10.1002/biot.201300448>
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153-176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>

- Ghaly, A. E., Kamal, M., & Correia, L. R. (2005). Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology*, *96*(10), 1143-1152. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.027>
- Gholamnejad, J., & Etebarian, H. R. (2009). Effect of calcium chloride on the biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple fruit. *Phytoparasitica*, *37*(3), 255-261. <https://doi.org/10.1007/s12600-009-0033-8>
- Gomez-Pastor, R., Perez-Torrado, R., Garre, E., & Matall, E. (2011). Recent Advances in Yeast Biomass Production. *Biomass - Detection, Production and Usage*, 201-222. <https://doi.org/10.5772/19458>
- 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., & 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., & 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., & 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., & 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>
- Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Vahèi, N., & Škrilin, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chem. Biochem. Eng. Q.*
- Gutiérrez Pulido, H. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw Hill México. <https://biblioteca.uazuay.edu.ec/buscar/item/63520>
- Harvey, J. M. (1978). Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. *Annual Review of Phytopathology*, *16*(1), 321-341. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.16.090178.001541>
- Herrero, A., & Guardia, J. (1992). *Conservación de frutos, manual técnico*. Mundi-Prensa. Madrid. ES. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=80160>
- Hu, H., Xu, Y., Lu, H., Xiao, R., Zheng, X., & 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. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400162>

- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., & Alizadeh, A. (2011). A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage: A review of mechanisms of action of biological control organisms. *EPPO Bulletin*, 41(1), 65-71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x>
- Janisiewicz, W. (1996). Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology*, 86(5), 473-479.
- Janisiewicz, W. J., & 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. J., Pereira, I. B., Almeida, M. S., Roberts, D. P., Wisniewski, M., & Kurtenbach, E. (2008). Improved biocontrol of fruit decay fungi with *Pichia pastoris* recombinant strains expressing Psd1 antifungal peptide. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 218-225. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.010>
- Janisiewicz, W. J., Tworkoski, T. J., & Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90(11), 1196-1200. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1196>
- Kelman, A. (1989). *Introduction: The Importance of Research on the Control of Postharvest Diseases of Perishable Food Crops*.
- Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2016). Statistical optimization using Central Composite Design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. *Ecological Engineering*, 92, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.03.026>
- Kowalska, J., Krzywińska, J., & Tyburski, J. (2022). Yeasts as a potential biological agent in plant disease protection and yield improvement—A Short Review. *Agriculture*, 12(9), 1404. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091404>
- Kurtzman, C. P., & Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascospore 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., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5.^a ed., Vol. 1). Elsevier.
- Lappa, I., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & 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., Pérez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., & 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>
- Lidster, & Hildebrand. (1988). *Commercial storage of fruits and vegetables*. Agriculture and Agri-Food Canada. <https://publications.gc.ca/site/eng/448779/publication.html>
- Lidster, P. D., Hildebrand, P. D., Bérard, L. S., & Porritt, S. W. (1988). Commercial storage of fruits and vegetables. *Agriculture and Agri-Food Canada Ottawa, Ontario, Canada*.
- Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A., & Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in

- fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083-2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
- Lima, G., Castoria, R., De Curtis, F., Raiola, A., Ritieni, A., & De Cicco, V. (2011). Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 60(2), 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.12.010>
- Liu, J., Li, G., & Sui, Y. (2017). Optimization of culture medium enhances viable biomass production and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast, *Candida diversa*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02021>
- Liu, J., Tian, S.-P., Li, B.-Q., & Qin, G.-Z. (2009). Enhancing viability of two biocontrol yeasts in liquid formulation by applying sugar protectant combined with antioxidant. *BioControl*, 54(6), 817-824. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9229-6>
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S., & 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, W.-C., Gong, T., Wang, Q.-H., Liang, X., Chen, J.-J., & Zhu, P. (2016). Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Scientific Reports*, 6(1), 18439. <https://doi.org/10.1038/srep18439>
- 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., & 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>
- Liu, Z., Wei, H., Li, Y., Li, S., Luo, Y., Zhang, D., & Ni, L. (2014). Optimization of the spray drying of a *Paenibacillus polymyxa*-based biopesticide on pilot plant and production scales. *Biocontrol Science and Technology*, 24(4), 426-435. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.868865>
- Long, C.-A., Deng, B.-X., & Deng, X.-X. (2006). Pilot testing of *Kloeckera apiculata* for the biological control of postharvest diseases of citrus. *Annals of Microbiology*, 56(1), 13-17. <https://doi.org/10.1007/BF03174963>
- Long, C.-A., Wu, Z., & Deng, B.-X. (2005). Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by Strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. *European Food Research and Technology*, 221(1-2), 197-201. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1199-z>
- López, S. N., Sangorrín, M. P., & 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>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luo, B., Sun, H., Zhang, Y., Gu, Y., Yan, W., Zhang, R., & 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., Lopes, C. A., Sosa, M. C., & 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., & 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., & 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>
- Macarisin, D., Droby, S., Bauchan, G., & 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>
- Mahmood, K. T. (2015). Biomass production from *Kluyveromyces* spp. By using cheese whey. *Journal of Zankoy Sulaimani - Part A*, 17(4), 85-94. <https://doi.org/10.17656/jzs.10427>
- Manso, T., & 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>
- 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., Maeso, D., Bustamante, A., & 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*. Banco Interamericana de Desarrollo.
- Marsico, A. D., Velenosi, M., Perniola, R., Bergamini, C., Sinonin, S., David-Vaizant, V., Maggiolini, F. A. M., Hervè, A., Cardone, M. F., & Ventura, M. (2021). Native vineyard Non-*Saccharomyces* yeasts used for biological control of *Botrytis cinerea* in stored table grape. *Microorganisms*, 9(2), 457. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020457>
- Massart, S., & 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>
- Mathivanan, N. (2023). Harnessing fungal biocontrol agents for the management of plant diseases. *Journal of Mycopathological Research*, 61(1). <https://doi.org/10.57023/JMycR.61.1.2023.001>
- Melin, P., Hakansson, S., Eberhard, T. H., & Schnurer, J. (2006). Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 264-271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02778.x>

- Melin, P., Schnürer, J., & Håkansson, S. (2011). Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 107-112. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9522-5>
- Mellefont, L. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2003). Performance evaluation of a model describing the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 45-58. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00253-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00253-2)
- Meng, X., & Tian, S. (2009). Effects of preharvest application of antagonistic yeast combined with chitosan on decay and quality of harvested table grape fruit: Effects of preharvest antagonistic yeast and chitosan spray on table grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1838-1842. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3659>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mishra, P., Kshirsagar, P. R., Nilegaonkar, S. S., & Singh, S. K. (2012). Statistical optimization of medium components for production of extracellular chitinase by *Basidiobolus ranarum*: A novel biocontrol agent against plant pathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 52(5), 539-548. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100446>
- Moheman, A., Bhawani, S. A., Husaini, A., Alam, M. S., & Tariq, A. (2018). Fingerprinting techniques in food authentication and traceability of marine species. En *Fingerprinting Techniques in Food Authentication and Traceability* (pp. 397-422). CRC Press.
- Mondino, P. (2009). *Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha*. Universidad de la República, Facultad de Agronomía: CYTED.
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons.
- Mukerji, N. N., K. G. (1988). Biological Control—Concepts and Practices. En *Biocontrol Of Plant Diseases*. CRC Press.
- Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S., & Hesham, A. E.-L. (2020). Yeast a potential bio-agent: Future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1497-1510. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10321-3>
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (4th ed.). John Wiley & Sons. <https://books.google.com.ar/books?id=T-BbCwAAQBAJ>
- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Muñoz, C. J., Combina, M., Toro, M. E., de Figueroa, L. I. C., & 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>
- Navarta, L. G., Calvo, J., Calvente, V., Benuzzi, D., & Sanz, M. I. (2011). Freezing and freeze-drying of the bacterium *Rahnella aquatilis* BNM 0523: Study of protecting agents, rehydration media and freezing temperatures. *Letters in Applied Microbiology*, 53(5), 565-571. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03150.x>
- Navarta, L. G., Calvo, J., Posetto, P., Cerutti, S., Raba, J., Benuzzi, D., & Sanz, M. I. (2014). Postharvest control of gray mold in apples with lyophilized formulations of *Cryptococcus laurentii*: The effect of cold stress in the survival and effectiveness of

- the yeast. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2962-2968. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1303-0>
- Nian, L., Xie, Y., Zhang, H., Wang, M., Yuan, B., Cheng, S., & 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. (2001). *Control biológico de las principales enfermedades fungicas en postcosecha de fruta de pepita, mediante el uso de Candida sake (cpa-1) y Pantoea agglomerans (cpa-2)*. Universitat de Lleida.
- 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., Teixido, N., Miro, M., Vinas, I., & Usall. (2001). Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 543-551.
- Oliveira, C., Silva, M., Silva, C. E., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2018). Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrients source for low-cost mixed microbial PHA production. *Applied Sciences*, 8(10), 1817. <https://doi.org/10.3390/app8101817>
- Özmiğçi, S. (2009). *Ethanol production from cheese whey powder solution by fermentatio*. Dokuz Eylül University.
- Ozmiğçi, S., & Kargi, F. (2007a). Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 602-606. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02132.x>
- Ozmiğçi, S., & Kargi, F. (2007b). Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 876-880. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.015>
- Ozmiğçi, S., & Kargi, F. (2007c). Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. *Bioresource Technology*, 98(16), 2978-2984. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.005>
- Öztekin, S., & Karbancıoğlu-Güler, F. (2023). Biological control of green mould on mandarin fruit through the combined use of antagonistic yeasts. *Biological Control*, 180, 105186. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105186>
- Palou, L., Valencia-Chamorro, S., & Pérez-Gago, M. (2015). Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit: A Review. *Coatings*, 5(4), 962-986. <https://doi.org/10.3390/coatings5040962>
- Patiño-Vera, M., Jimenez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., & 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>
- Pelinski, R., Cerrutti, P., Ponsone, M. L., Chulze, S., & Galvagno, M. (2012). Statistical optimization of simple culture conditions to produce biomass of an ochratoxigenic mould biocontrol yeast strain: Biomass production of a biocontrol yeast. *Letters in Applied Microbiology*, 54(5), 377-382. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03217.x>

- Pesce, V. M., Nally, M. C., Carrizo, G. P., Rojo, C., Pérez, B. A., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L. I., & Vazquez, F. (2018). Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. *Biological Control*, *120*, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.005>
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., & Gullino, M. L. (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, *11*(3), 131-140. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00022-7)
- Ponsone, M. L., Chiotta, M. L., Combina, M., Dalcerro, A., & 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>
- Prabakaran, G., & Hoti, S. L. (2008). Optimization of spray-drying conditions for the large-scale preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* after downstream processing. *Biotechnology and Bioengineering*, *100*(1), 103-107. <https://doi.org/10.1002/bit.21722>
- Prajapati, S., J. B., Hati, S., & Jigar Trivedi, V. S. (2017). Deproteinated cheese whey medium for biomass production of probiotic *Lactobacillus helveticus* MTCC 5463. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(3), 174-187. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.019>
- Qin, G. Z., & Tian, S. P. (2004). Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a Low dosage of fungicides under different storage conditions. *Plant Disease*, *88*(5), 497-501. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.497>
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1990). *Yeast Technology* (Second). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-9771-7>
- Robiglio, A., Sosa, M. C., Lutz, M. C., Lopes, C. A., & 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>
- Rodriguez-Navarro, C., González-Muñoz, M. T., Jimenez-Lopez, C., & Rodriguez-Gallego, M. (2011). Bioprotection. En J. Reitner & V. Thiel (Eds.), *Encyclopedia of Geobiology* (pp. 185-189). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_35
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., & 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>
- Rozycki, S. D. (2021). *Situación del suero de quesería en la Argentina y alternativas de su revalorización*. Universidad Nacional del Litoral. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/situacion-suero-queseria-argentina-t46668.htm>
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., & Hernández, A. (2016). Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*, *57*, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.003>

- Ryan, M. P., & 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>
- Saligkarias, I. D., Gravanis, F. T., & Epton, H. A. S. (2002). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. a study on mode of action. *Biological Control*, 25(2), 151-161. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00052-X](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00052-X)
- Santagni, A., Nievas, W. E., Di Masi, S. N., & 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_CRPatagoniaNorte_EEAAltoValle_Santagni_A_Prospectiva_fruticola_alto_valle_rio_negro_al-2035.pdf?sequence=1
- Sanzani, S. M., Nigro, F., Mari, M., & Ippolito, A. (2009). Innovations in the control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Arab J. Pl. Prot.*, 27 (2), 240-244.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., & Ippolito, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30(3), 209-220. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00111-X)
- Schisler, D. A., Janisiewicz, W. J., Boekhout, T., & 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>
- Schnierda, T., Bauer, F. F., Divol, B., van Rensburg, E., & Görgens, J. F. (2014). Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non- *Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 478-485. <https://doi.org/10.1111/lam.12217>
- SENASA. (2018). Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/senasa>
- SENASA. (2022). “Situación de la Producción Orgánica en la Argentina durante el año 2022”. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/1_situacion_de_la_po_en_la_argentina_ano_2022.pdf
- Sepúlveda, X., Silva, D., Ceballos, R., Vero, S., López, M. D., & 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., & 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>
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering: Basic concepts* (2nd ed). Prentice Hall.
- Siddiqui, M. W. (Ed.). (2015). *Postharvest Biology and Technology of Horticultural Crops. Principles and Practices for Quality Maintenance*. Apple Academic Press. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781498709248>

- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- 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)
- Smilanick, J. L., Brown, G. E., & Eckert, J. W. (2006). Postharvest citrus diseases and their control. *Fresh Citrus Fruits*, 2.
- 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-Scwl9skYC>
- Sommer, N. F. (1985). *Strategies for control of postharvest diseases of selected commodities*. Coop Ext. Univ. of California, Div. of Agric and Natural Resource.
- Sørensen, S. P. L. (1908). I: Über die quantitative Messung proteolytischer Spaltungen, Die Formoltitrierung. Enzymstudien. *Biochem Z*, 7, 45-48.
- Spadaro, D., Ciavarella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(2), 128-137. <https://doi.org/10.1139/W09-117>
- Spadaro, D., & 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>
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., & Gullino, M. L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24(2), 123-134. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00172-7)
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & 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>
- Sun, C., Fu, D., Lu, H., Zhang, J., Zheng, X., & Yu, T. (2018). Autoclaved yeast enhances the resistance against *Penicillium expansum* in postharvest pear fruit and its possible mechanisms of action. *Biological Control*, 119, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.010>
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., & 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., & 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., Qin, G., & Xu, Y. (2004). Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 33(3), 327-331. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.03.010>

- 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., Tabatabaekoloor, R., & 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 Alarcón, E. A. (2009). *Estudio de compatibilidad de la levadura Pichia onychis Lv027 con excipientes y caracterización de la formulación modificada*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Torres Leal, G. J. (1996). Tecnología de postcosecha. *Manual de producción de limón. Serie A*, 2.
- Torres, R., Nunes, C., García, J. M., Abadias, M., Viñas, I., Manso, T., Olmo, M., & Usall, J. (2007). Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 73-83. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9120-1>
- Torres, R., Solsona, C., Viñas, I., Usall, J., Plaza, P., & 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., & 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>
- Tulukoğlu-Kunt, K. S., Özden, M., & Di Francesco, A. (2023). Exploring wild and local fruits as sources of promising biocontrol agents against *Alternaria* spp. In apples. *Horticulturae*, 9(10), 1156. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9101156>
- Usall, J., Torres, R., & 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>
- Vamvakaki, A.-N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences*, 10(4), 348-360. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000063>
- Vargas, M., Garrido, F., Zapata, N., & Tapia, M. (2012). Isolation and selection of peiphytic yeas for biocontrol of *Botrytis cinerea* pers. On table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(3), 332-337.
- Vera Candioti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S., & Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
- Verma, S., Azevedo, L. C. B., Pandey, J., Khusharia, S., Kumari, M., Kumar, D., Kaushalendra, Bhardwaj, N., Teotia, P., & Kumar, A. (2022). Microbial Intervention: An Approach to Combat the Postharvest Pathogens of Fruits. *Plants*, 11(24), 3452. <https://doi.org/10.3390/plants11243452>

- Vero, S., Garmendia, G., Garat, M. F., de Aurrecoechea, I., & Wisniewski, M. (2011). *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *Acta Horticulturae*, 905, 169-180. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.905.18>
- Vieira, É. D., Andrietta, M. da G. S., & Andrietta, S. R. (2013). Yeast biomass production: A new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 551-558. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200035>
- Villalba, M. L., Lutz, M. C., Lopez, S., Pildain, M. B., & 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
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., & Sanchis, V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 9-16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00009-9)
- Visintin, G., Gioco, I., García, B., & 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.
- Vohra, A., & Satyanarayana, T. (2002). Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochemistry*, 37(9), 999-1004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00308-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00308-9)
- Vorländer, K., Pramann, P., Kwade, A., Finke, J. H., & Kampen, I. (2023). Process and formulation parameters influencing the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during spray drying and tableting. *International Journal of Pharmaceutics*, 642, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123100>
- Wang, P., Liu, X., Wang, Y., Ruan, H., & Zheng, X. (2011). Statical media optimization for the biomass production of postharvest biocontrol yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 41(4), 382-397. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.552143>
- Wilson, C. L. (2018). World food preservation center book series. (No Title). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1194.2>
- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 425-441. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.002233>
- Wisniewski, M., Macarasin, D., & Droby, S. (2010). Challenges and opportunities for the comercialization of postharvest biocontrol. *Acta Horticulturae*, 877, 1577-1582. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.877.217>
- Xu, X., Chan, Z., Xu, Y., & Tian, S. (2008). Effect of *Pichia membranaefaciens* combined with salicylic acid on controlling brown rot in peach fruit and the mechanisms involved: Control of brown rot by antagonistic yeast and SA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(10), 1786-1793. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3281>
- Xu, X.-M., & Berrie, A. M. (2005). Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with Fusarium ear blight and apple blue mould: A review. *Food Additives & Contaminants*, 22(4), 290-301. <https://doi.org/10.1080/02652030500058353>

- Yamahata, N., Toyotake, Y., Kunieda, S., & Wakayama, M. (2020). Optimal fermentation conditions and storage period of fermented beverages made from demineralized whey using *Kluyveromyces marxians*. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 03(01). <https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000035>
- Yáñez-Mendizábal, V. (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>
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Abadias, M., & Teixidó, N. (2012). Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 954-965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05258.x>
- Yang, S. T., & 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)
- Zajc, J., Černoša, A., Francesco, A. D., Castoria, R., Curtis, F. D., Lima, G., Badri, H., Jijakli, H., Ippolito, A., Gostinčar, C., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., & Janisiewicz, W. J. (2020). Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolates selected as biocontrol agents against fruit decay pathogens. *Fungal Genomics & Biology*, 10(163), 1-13.
- Zhang, C., Chen, K., & 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://doi.org/10.1007/s10526-012-9477-8>
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010a). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*, 54(3), 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.003>
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010b). Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 55(3), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.09.007>
- Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Zhang, H., & Zheng, X. (2008). Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 167-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.018>
- Zhang, H., Zheng, X., & Yu, T. (2007). Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*, 18(4), 287-291. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.007>
- Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y., & Tian, S. (2020a). 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>
- Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y., & Tian, S. (2020b). 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., & 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., & 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. <https://doi.org/10.5829%2Fidosi.wasj.2014.31.05.14534>