



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

# ***Objetivos***

---

## OBJETIVOS

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

# ***Material y Métodos***

---

# MATERIAL.

## 1. Equipos.

### 1.1. Microcámaras.

El microorganismo antagonista la cepa *Candida sake* (CPA-1) actúa como agente de biocontrol en condiciones de frigoconservación, por lo que se realizan pruebas de crecimiento en diferentes atmósfera de frigoconservación y a pequeña escala, utilizando microcámaras diseñadas en el Laboratori de Patologia del Centre UdL-IRTA, con las siguientes características:

- **Volumen:** 200 l.
- **Tapa frontal extraíble.**
- **Material:** cuerpo de acero lacado y tapa del mismo material, con visor de acrílico de 23 x 23 cm<sup>2</sup>.
- **Otras características:** cada unidad dispone de un termómetro con registro automático de temperatura ( $\pm 0,1$  °C), con ventilador accionado por un temporizador (15 min cada 4 h) para homogeneizar la atmósfera interna.

El control de la atmósfera se realiza mediante un analizador-controlador centralizado equipado con una celda para análisis de O<sub>2</sub> de tipo paramagnético (precisión de  $\pm 0,1$  %, rango 0 - 100 %), y una celda para análisis de CO<sub>2</sub> de infrarrojo (precisión de  $\pm 0,1$  %, rango 0 - 15 %). El control se lleva a cabo fijando los valores de consigna para ambos gases, analizando cíclicamente el contenido de ambos gases en cada unidad (periodos variables según el número de unidades activas, entre 2 y 5 h) y aplicando, en caso necesario, las siguientes correcciones:

- Defecto de oxígeno: inyección de aire comprimido.
- Defecto de dióxido de carbono: inyección de CO<sub>2</sub> gas al 100 %.

Exceso de oxígeno o dióxido de carbono: barrido con nitrógeno gas de pureza superior al 99,99 %.

Los tiempos de inyección son múltiplos de un tiempo base fijado por el usuario, y los flujos de inyección pueden fijarse por el usuario entre 0 y 1000 ml/min.

Las microcámaras fueron preparadas y acondicionadas para realizar pruebas en las siguientes condiciones:

- Temperatura: 0,5 - 1,0 °C.
- Humedad Relativa: 90 - 98 %.

Y a diferentes concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono.(Tabla 2).

Tabla 2: Condiciones de concentraciones de oxígeno y de dióxido de carbono aplicadas en las microcamaras.

CONCENTRACIÓN DE O <sub>2</sub>	CONCENTRACIÓN DE CO <sub>2</sub>
1 %	1 %
1 %	2 %
1 %	4 %
2 %	1 %
2 %	2 %
2 %	4 %
2 %	6 %
2 %	8 %
3 %	3 %
3 %	6 %

## 1.2. Fermentador.

Las pruebas de crecimiento del antagonista *C. sake* (CPA-1) se realizan en fermentador, en las mejores condiciones de crecimiento determinadas experimentalmente. El fermentador que se utiliza es el modelo FBL de la marca Gallenkamp tiene las siguientes características:

- **Capacidad:** 5 l.
- **Recipiente:** envase de vidrio de borosilicato que resiste el autoclavado.
- **Tapa frontal :** de acero inoxidable, y cerrado hermético con recipiente con entrada para agitador, aireador y regulador del bombeo de oxígeno.
- **Otras características:** cada unidad dispone de:

Un agitador marca Heidolph, modelo RZR1.

Un modulador de aireación modelo FSL 425010F.



Regulador de temperatura, modelo FBL 360010P.

Regulador de pH modelo FBL 725010E.

Modulador de oxígeno 505010L, modelo FBL80010R.

### 1.3. Novasina.

Para medir la actividad de agua ( $a_w$ ) de los medios de cultivo preparados, se utiliza la Novasina de Humedad IC II.

- **Modelo:** Thermoconstanter TH 200, Axair Ltda. Systems for Air Treatment, Pfäffikon, Switzerland.

**Precisión:** Tiene un rango de humedad de 0,05 - 1,0 de  $a_w$  con una repetitibilidad de  $\pm 0,005$ .

Un rango de temperatura de -20 a 80 °C. y una resolución  $\pm 0,01 a_w \pm 0,2$  °C.

- **Características:** Consta de un regulador de temperatura y humedad TH2, con un sensor BKS.

### 1.4. Centrifuga.

Para la separación del antagonista, de su medio de crecimiento, se utiliza la centrifuga marca Beckman:

- **Modelo:** Avanti J - 25.

**Precisión:** tiene un rango de velocidad de 100 a 25000 rpm con una precisión de  $\pm 10$  rpm.

Un rango de temperatura de -20 a + 40 °C y una resolución de  $\pm 2$  °C.

- **Características:** se utiliza el rotor JA -14, a 7500 rpm a 10 °C por 10 min con un máximo de aceleración y desaceleración.

## 2. Material vegetal.

### 2.1. Manzanas.

Para la realización de los ensayos *in vivo* en el laboratorio, se utiliza la manzana "Golden Delicious", la más importante en Lleida por su volumen de producción y frigoconservación.

La fruta procede en algunos casos directamente del campo y en otros de cámaras frigoríficas, pero dentro de un período máximo de almacenamiento de 3 meses y sin ningún tratamiento de postcosecha.

En cada ensayo se selecciona fruta de calibre mediano con adecuado grado de madurez, con pulpa medianamente compacta, fina y dulce, color verde amarillento, forma esferoidal, sin golpes ni magulladuras y con un buen estado sanitario (Tabla 3).

Tabla 3: Valores de calidad recomendados por el Servicio Técnico del IRTA para la conservación óptima de manzanas "Golden Delicious" de la zona de Lleida.

PARÁMETROS	RANGO
Firmeza mínima	6,3 - 6,8 kg/cm <sup>2</sup>
Firmeza óptima	7,3 - 8,2 kg/cm <sup>2</sup>
Sólidos solubles	> 111 g/l
Acidez	4,0 - 5,0 g ácido málico/l
Índice de almidón	2,0 - 3,0

La fruta es almacenada en cámaras de frío convencional a 1 °C. con 90 - 98 % de humedad.

### 3. Microorganismo antagonista.

Se trabaja durante todas las experiencias con la cepa *Candida sake* (CPA-1), levadura que pertenece a la colección de cultivos microbianos de la Unitat de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida.

La referida levadura forma parte de la flora epífita de la propia manzana y fue aislada de la superficie de la manzana "Golden Delicious", procedente de una cámara frigorífica y según estudios previos, presenta una buena capacidad inhibitoria de podredumbres causadas por el hongo *Penicillium expansum* (Usall, 1995).

### 4. Patógeno.

La cepa patógena a controlar utilizada durante todo el trabajo es la CMP-1 de *Penicillium expansum* que pertenece a la colección de cultivos de la Unitat de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida y que fue aislada de fruta podrida obtenida de cámaras frigoríficas de la Comarca de El Segrià.

La cepa seleccionada es la de mayor grado patogénico de toda la colección y es conservada en medio de cultivo PDA con periódicas resiembras y transferencias a fruta con el objetivo de



mantener su patogenicidad.

## 5. Sustancias nutritivas.

Se utilizan varias sustancias nutritivas en base a la bibliografía consultada, y a resultados experimentales anteriores, tal es el caso de pruebas de crecimiento del microorganismo con fuentes de nitrógeno fundamentadas en la metodología descrita por Janisiewicz *et al* (1992), fuentes de potasio, sales minerales (Reed y Nagodawithana, 1991; Beudeker *et al.*, 1989), resultados obtenidos por Usall (1995) y Amador (1996) (Tabla 4).

Tabla 4: Sustancias nutritivas utilizadas en medios de cultivo.

---

### NUTRIENTES UTILIZADOS

---

Sulfato de amonio

Fosfato hidrógeno de potasio

Glucosa

Urea

Biotina

Piridoxina

Sulfato de manganeso

Sulfato de cobre

---

## 6. Medios de crecimiento.

Se realizan varias pruebas de crecimiento en diferentes medios (Tabla 5) con el objetivo de determinar el más adecuado de cara a una producción a nivel industrial de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Tabla 5: Medios de crecimiento para la cepa *C. sake* (CPA-1).

<b>MEDIOS DE CRECIMIENTO</b>
Levadura de cerveza
Bagazo de cebada
Concentrado de zumo de manzana
Germen de cebada
Melaza de caña de azúcar
Melaza de remolacha azucarera
Lactosuero
Derivado láctico

### 6.1. Precio de los medios de crecimiento y suplementos nutritivos.

Los medios de crecimiento utilizados para realizar las diferentes experiencias con la cepa *C. sake* (CPA-1) son económicos y se toman como referencia su precio (actualizado a mayo de 1998) como materia prima en pesetas/kilogramo o litro (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Precios de los medios de crecimiento

<b>MEDIO CRECIMIENTO</b>	<b>PRECIO</b>
Levadura de cerveza	5 ptas./kg
Bagazo de cebada	5 ptas./kg
Concentrado de manzana	250 ptas./kg
Germen de cebada	30 ptas./kg
Melaza de caña de azúcar	14,8 ptas./kg
Melaza de remolacha azucarera	14,6 ptas./kg
Lactosuero	15 - 20 ptas./l

Las sustancias nutritivas utilizadas para enriquecer los medios de crecimiento, inicialmente son reactivos puros, con precios altos, pero luego de determinar los mejores, se utilizan reactivos menos puros y con menor precio (precios actualizados a mayo de 1998) (Tabla 6.2).

Tabla 6.2: Precios de los suplementos nutritivos, utilizados en los medios de crecimiento.

SUPLEMENTO NUTRITIVO	PRECIO
Sulfato de amonio puro	5140 ptas./kg
Sulfato de amonio 98 % de pureza	850 ptas./kg
Sulfato de amonio 90 % de pureza	420 ptas./kg
Urea pura	3800 ptas./kg
Urea cristalina 98% de pureza	740 ptas./kg
Urea 46 % de pureza	40 ptas./kg
Piridoxina	590000 ptas./kg
Biotina	5880000 ptas./kg
Glucosa	67100 ptas./kg
Fosfato dihidrógeno de potasio	9100 ptas./kg
Sulfato de manganeso	6400 ptas./kg
Sulfato de cobre	8300 ptas./kg

## 6.2. Levadura de cerveza.

El extractos de levadura de cerveza, es obtenido después de varias fermentaciones de cerveza. La levadura de cerveza que ha sido utilizada varias veces, se agota y el líquido que la contiene con un poco de mosto fermentado de cerveza, lúpulo y otros materiales utilizados para su fabricación, se separa y este líquido es rico en aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos.

La composición nutritiva varía en función de la composición de los sustratos utilizados para la producción de la cerveza y en función de la variedad. Es una fuente de carbono, proteínas y vitaminas, el 40 o 50 % de su composición es mayoritariamente carbohidratos y contiene altos niveles de ácidos nucleicos (Bridson y Brecker, 1987; Hough *et al.*, 1982; Crueger y Crueger, 1989), el líquido puede ser neutralizado, clarificado y concentrado hasta pasta o polvo seco, cuya composición aproximada se detalla en la Tabla 7 (Briggs, *et al.*, 1981).

Tabla 7: Composición del extracto de levadura de cerveza deshidratado.

Humedad	6 %
Material seco, que contiene:	70 %
Grasa	6 %
Cenizas	8 %
Proteína	45 %
Nitrógeno total	8,8 %
Alanina	3,4 %
Arginina	2,1 %
Cistina	0,3 %
Glicina	1,6 %
Metionina	0,5 %
Calcio	0,75 mg/g
Magnesio	1,65 mg/g
Potasio	21,0 mg/g
Hierro	0,02 mg/g
Tiamina	150 ppm
Riboflavina	45 ppm
Piridoxina	40 ppm
Niacinamida	400 ppm
Ácido pantoténico	200 ppm

### 6.3. Bagazo de cebada.

El bagazo de cebada es un subproducto de la producción de cerveza obtenido después del malteado y maceración del grano triturado de cebada, y es el residuo sólido del filtrado del mosto.

Contiene celulosa y hemicelulosas como fuentes de carbono, proteínas, lípidos y minerales, por lo que es un medio rico en nutrientes para el crecimiento de levaduras.

Su composición es variada, dependiendo del tipo de cerveza y los suplementos adicionados al medio, y se detalla en la Tabla 8 (Briggs *et al.*, 1981; Chandler, 1993).

**Tabla 8: Composición del bagazo de cebada.**

Extracto seco, que contiene:	24 %
pH	4,5
Nitrógeno libre	40 %
Fibra cruda	16 %
Grasa	1,2 %
Proteína cruda	26 %
Proteína soluble	7 %
Carbono como fuente de energía	67 %
Calcio	0,29 %
Fósforo	0,54 %
Magnesio	0,15 %
Sodio	0,28 %
Potasio	0,09 %
Sulfuros	0,34 %
Hierro	270 ppm
Cobre	22 ppm
Manganeso	41 ppm
Zinc	106 ppm

#### 6.4. Germen de cebada.

El germen de cebada constituye el producto obtenido de la separación de las raicillas de los granos germinados de cebada convertido en malta, y secado.

Son extremadamente higroscópicos y se almacenan fuera del contacto con el aire, es una materia prima rica en vitaminas del complejo B, especialmente ácido pantoténico, vitamina E, péptidos, aminoácidos y proteínas. Aproximadamente las tres cuartas partes de la proteína cruda es proteína

verdadera, contiene lisina, betaina, tiramina, hordenina, candicina, nucleótidos y alantoina.

La composición aproximada del germen de cebada, se detalla en la Tabla 9 (Briggs *et al.*, 1981).

Tabla 9: Composición del germen de cebada.

Humedad	< 7 %
pH	5,3
Proteína cruda, de la que:	26,88 %
Proteína soluble	7,13 %
Fibra cruda	14,68 %
Grasa	2,2 %
Nitrógeno libre	50,27 %
Carbohidratos: de los que	66 %
Celulosa	10 %
Pentosas	18,9 %
Minerales	7 %
Calcio	0,37 %
Fósforo	0,66 %
Magnesio	0,26 %
Sodio	0,02 %
Potasio	0,09 %
Sulfuros	0,23 %
Hierro	148,09 ppm
Cobre	22,28 ppm
Manganeso	44,97 ppm
Zinc	87,84 ppm

## 6.5. Concentrado de zumo de manzana.

El concentrado de zumo de manzana, se obtiene a partir de la evaporación del zumo de manzana pasteurizado y despectinizado en evaporadores al vacío, hasta llegar a un concentrado de 10 a 70°Brix en función de los requerimientos industriales para su comercialización. Tiene entre sus principales componentes el ácido málico que corresponde al 0,5 % del contenido total del zumo, trazas de ácido cítrico, quínico, citromálico, ácido galacturónico que resulta de la ruptura de las pectinas.

La vitamina C o ácido ascórbico que es la vitamina predominante en el zumo de manzana se

degrada durante su proceso de fabricación al ser sometido a elevadas temperaturas, y el ácido málico se degrada durante el almacenamiento.

Los azúcares presentes son la fructosa, glucosa sacarosa y xilosa, siendo predominante la fructosa que corresponde a las 2/3 partes del total de azúcares presentes (Varnam y Sutherland, 1994). La composición del zumo de manzana que se comercializa y que corresponde al concentrado de zumo de manzana diluido, presenta la siguiente composición (Lee y Mattick, 1989) (Tabla 10):

**Tabla 10: Composición del concentrado de zumo de manzana.**

Extracto seco	0,207 %
Brix	12,74 °
pH	3,69
Prolina	5,47 ppm
Gravedad específica	1,051 g/ml
Acidez total	0,417 % (ácido málico)
Sorbitol	0,524 g/100 ml
Sacarosa	2,68 g/100 ml
Fructosa	7,2 g/100 ml
Glucosa	3,48 g/100 ml
Cadmio	6,22 ppb
Calcio	38,61 ppm
Hierro	1,095 ppm
Plomo	33,65 ppb
Fósforo	125,36 ppm

## 6.6. Lactosuero.

Al ser el lactosuero el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la fabricación de quesos, o la fase acuosa que se separa de la cuajada tras la separación de la mayor parte de caseína y grasa, es un medio rico en nutrientes: lactosa como fuente de carbono, sales minerales, vitaminas solubles, proteínas solubles y un poco de grasa (Scott, 1991).

Según el procedimiento utilizado para separar la cuajada del queso, es decir según se haya empleado la coagulación ácida o enzimática por cuajo, se obtiene lactosuero dulce o lactosuero ácido, y el empleo de uno u otro procedimiento de separación de la cuajada del queso, determina también una diferente composición del lactosuero (Spreer, 1991).

El lactosuero utilizado como medio de crecimiento es el lactosuero suave, cuya composición se



detalla en la Tabla 11 (Spreer, 1991; Lopez *et al.*, 1996).

Tabla 11: Composición del lactosuero dulce fresco.

Agua	93 - 94 %
Extracto seco	6 - 7 %
pH	6,5
Lactosa	4,5 - 5 %
Ácido láctico	trazas
Proteína	0,8 - 1 %
Cenizas	0,5 - 0,7 %
Ácido cítrico	0,15 %
Grasa	0,2 %
Calcio	0,7 %
Fósforo	0,5 %
Sodio	0,08 %
Potasio	0,06 %
Magnesio	0,04 %
Tiamina	4,22 mg/100 g
Riboflavina	1,86 mg/100 g

## 6.7. Derivado láctico.

Es el producto obtenido de la evaporación del lactosuero hasta obtener aproximadamente un extracto seco alrededor del 55 %, debido a la evaporación, presenta una similar composición que el lactosuero dulce, pero por efectos de la temperatura, existe una mayor presencia de aminoácidos por la ruptura de proteínas, y coagulación de las globulinas, ya que un lactosuero normal contiene un 0,8 % de proteínas como albuminas y globulinas.

La composición aproximada del derivado láctico (Sottiez, 1989), se detalla en la Tabla 12.

**Tabla 12: Composición aproximada del derivado láctico.**

Extracto seco	66 %
pH	6,1
Lactosa	75 %
Proteína	13 %
Cenizas	9 %
Ácido láctico	2,2 %
Grasa	1,0 %
Calcio	0,7 %
Fósforo	0,7 %
Cloruros (NaCl)	2,5 %

### **6.8. Melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera.**

Las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera generalmente son las más utilizadas como medio de crecimiento para la producción de levaduras a nivel industrial por tener una potencial fuente de azúcares y nutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras. Las melazas de remolacha azucarera se utilizan en regiones donde no hay producción de caña de azúcar que se utiliza en áreas subtropicales, y presenta una composición similar (Tabla 13); las dos variedades de melazas son baratas.

A continuación se describe la composición de las melazas (Tabla 13) (Imrie, 1969; Reed , 1981; Crueger y Creger, 1989).

Tabla 13: Composición de melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera.

COMPOSICIÓN	MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR	MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA
Material seco, que contiene:	80,5 %	81,5 %
Fuentes de carbono	28 - 33 %	28 - 34 %
Fuentes de nitrógeno	0,4 - 1,5 %	0,2 - 2,8 %
Azúcares, que son:	73,1 %	66,5 %
Sacarosa	45,5 %	63,5 %
Rafinosa	0 %	1,5 %
Azúcares Invertidos	21,2 %	1,0 %
Otros azúcares	5,5 %	1,5 %
Compuestos orgánicos	15,5 %	23,0 %
Ácido glutámico	2,4 %	4,0 %
Otras fuentes nitrógeno	3,1 %	0 %
Otros aminoácidos	0 %	3,0 %
Compuestos inorgánicos	11,7 %	10,5 %
K <sub>2</sub> O	5,3 %	6,0 %
Na <sub>2</sub> O	0,1 %	1,0 %
CaO	0,2 %	0,2 %
MgO	1,0 %	0,2 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0 %	0,1 %
SiO <sub>2</sub>	0 %	0,1 %
Cl	1,1 %	1,7 %
SO <sub>2</sub> + SO <sub>3</sub>	2,3 %	0,5 %
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,8 %	0,1 %
N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0 %	0,4 %
Biotina	120 mg/100 g	5,3 mg/100 g
Ácido fólico	3,8 mg/100 g	21 mg/100 g
Ác. pantoténico	2,14 mg/100 g	130 mg/100 g
Niacinamida	2,1 mg/100 g	5,1 mg/100 g
Tiamina	830 mg/100 g	130 mg/100 g
Riboflavina	250 mg/100 g	41 mg/100 g
Piridoxina	650 mg/100 g	540 mg/100 g

## 7. Antibiótico.

En determinados ensayos para poder realizar un mejor recuento de las levaduras, se utilizan placas con medio NYDA con estreptomomicina en concentración de 0,5 g/l para inhibir el crecimiento de las bacterias.

## 8. Curva de correlación porcentaje de transmitancia - concentración (ufc/ml) de la cepa *C. sake* (CPA-1).

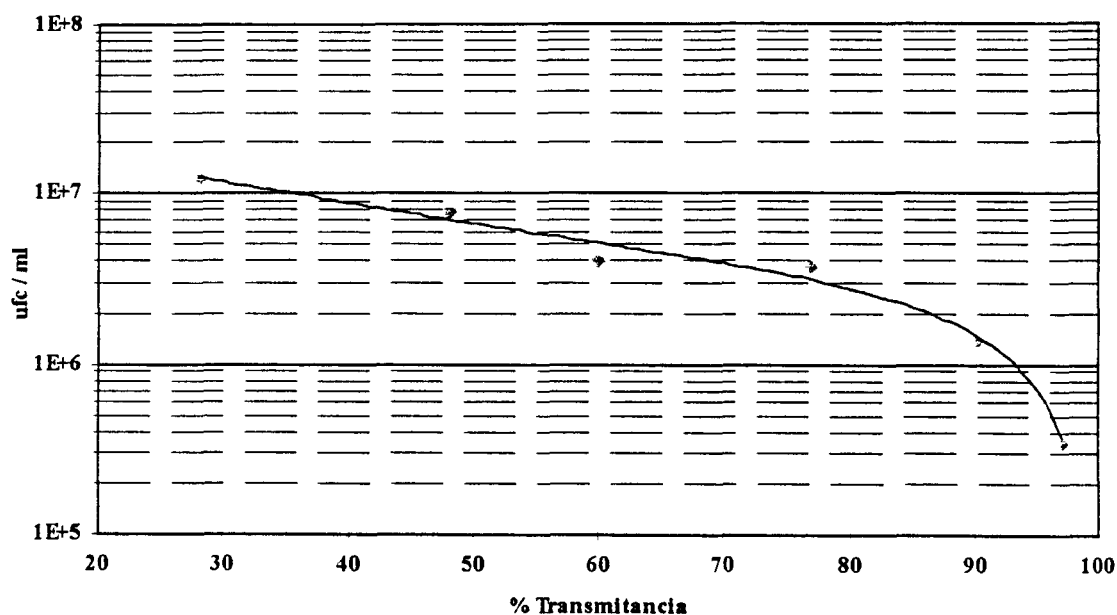


Figura 2: Curva de correlación %T/ Concentración (ufc/ml) de la cepa (CPA-1) de *C. sake* (Miró, M.A., 1997). Ajuste mediante el programa informático Microsoft Excel 5.0 a una función polinómica de tercer grado de ecuación:  $y = -40,516x^3 + 8957,4x^2 - 772506x + 3E+07$ .

## **MÉTODOS.**

### **1. Medios de cultivo.**

#### **1.1. Normas generales de preparación.**

##### **1.1.1. Medio de cultivo para repartir en placas.**

Para la preparación de medios de cultivo sólidos en placa, se procede de la siguiente manera:

1. Pesar las sustancias que componen el mencionado medio.
2. Diluir en la cantidad correspondiente de agua destilada.
3. Se ajusta el pH.
4. Adicionar la cantidad de agar correspondiente.
5. Se vacía en un matraz Erlenmeyer.
6. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.
7. Repartir asépticamente con cuidado de no formar burbujas en las placas Petri estériles.

##### **1.1.2. Medios de cultivo sólidos para repartir en tubos.**

Para preparar medios de cultivo y colocarlos en tubos de ensayo, se procede de la siguiente manera:

1. Pesar las sustancias que componen el mencionado medio.
2. Diluir en la cantidad correspondiente de agua destilada.
3. Ajustar el pH.
4. Adicionar la cantidad de agar correspondiente y hervir con agitación constante hasta total dilución.
5. Colocar una cantidad adecuada en tubos de ensayo y tapar.
6. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.
7. Sacar y rápidamente, inclinar los tubos para aumentar la superficie del cultivo y dejar así hasta que se enfríe y solidifique el medio.

##### **1.1.3. Medios de cultivo líquidos para repartir en tubos.**

Se preparan los medios de cultivo líquidos para poner en tubos de ensayo de la siguiente manera:

1. Pesar las sustancias que componen el medio.
2. Se disuelve en la cantidad correspondiente de agua destilada.
3. Ajustar el pH.
4. Colocar una cantidad adecuada de medio en cada tubo de ensayo y tapar.
5. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.
6. Se enfría antes de utilizar.

## 2. Medios de cultivo generales.

### 2.1. Agar Nutritivo Levadura Dextrosa (NYDA).

#### COMPOSICIÓN

• Caldo nutritivo	8 g
• Extracto de levadura	5 g
• Glucosa	10 g
• Agar	15 g
• Agua destilada	1000 ml

#### PREPARACIÓN

Mezclar los componentes en la cantidad de agua correspondiente, ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

### 2.2. Caldo Nutritivo Levadura Dextrosa (NYDB).

#### COMPOSICIÓN

• Caldo nutritivo	8 g
• Extracto de levadura	5 g
• Glucosa	10 g
• Agua destilada	1000 ml

#### PREPARACIÓN

Mezclar los componentes en la cantidad correspondiente de agua, ajustar el pH del medio a 7 y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

### 2.3. Agar Patata Dextrosa (PDA).

#### COMPOSICIÓN

- Bacto-Patata Dextrosa 39 g
- Agua destilada 1000 ml

#### PREPARACIÓN

Mezclar y homogeneizar los componentes del medio en agua destilada. Ajustar el pH aproximadamente a 5,6. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

## 3. Medios de cultivo específicos.

### 3.1. Medio mínimo salino para levaduras.

Utilizada por Usall, (1995).

#### COMPOSICIÓN

Para 1000 ml de medio.

*Como fuente nitrogenada:*

- Sulfato de amonio 5 g

*Como fuente de carbono*

- Glucosa 10 g

*Sales:*

- Fosfato dihidrógeno de potasio 850 mg
- Fosfato hidrógeno de potasio 150 mg
- Sulfato de magnesio pentahidratado 500 mg
- Cloruro de sodio 100 mg
- Cloruro de calcio dihidratado 67 mg



*Microelementos:*

• Ácido bórico	500 mg
• Sulfato de cobre pentahidratado	40 mg
• Cloruro férrico hexahidratado	200 mg
• Sulfato de manganeso monohidratado	303 mg
• Molibdato de sodio dihidratado	200 mg
• Sulfato de zinc heptahidratado	400 mg

Además se incorporan al medio mínimo diferentes combinaciones de vitaminas (Barnett *et al.*, 1990), que se han seleccionado en base a bibliografía y resultados de experiencias realizadas en el laboratorio de la Unitat de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida, en los que se estudió el efecto de las vitaminas y combinaciones de las mismas para el crecimiento de la cepa de *C. sake* (CPA-1) (Amador, 1996).

• Biotina	20 mg
• Tiamina	400 mg
• Piridoxina	400 mg
• Ácido fólico	2 mg
• Ácido nicotínico	400 mg
• Riboflavina	200 mg
• Ácido pantoténico	2 mg
• Agua destilada	hasta llegar a un volumen de 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Disolver el sulfato de amonio en un volumen de 20 ml de agua destilada y esterilizar por filtración.

La glucosa disolver en un volumen de 50 ml de agua destilada, esterilizar en un envase de vidrio por separado en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Disolver las trazas de elementos cada uno por separado en un volumen de 20 ml de agua destilada y esterilizar por separado por filtración.

Las sales se disuelven por separado en un volumen de 50 ml de agua destilada y se esterilizan en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Las vitaminas se disuelven por separado en un volumen de 20 ml de agua destilada y se esterilizan por filtración.

Mezclar en el interior de una cabina de flujo laminar en un recipiente estéril todas las soluciones preparadas, y aforar a un litro con agua destilada estéril.

## 4. Medios de cultivo simples para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

A pesar de ser medios de composición compleja, se les da el nombre de MEDIOS SIMPLES, por facilidad de asignación de denominaciones de cada uno de los medios que se preparan.

### 4.1. Medio levadura de cerveza.

Por su composición rica en nutrientes (apartado 6.2 de materiales) se realiza el crecimiento del antagonista en este medio a diferentes concentraciones. Se prepara el medio en cuatro concentraciones en porcentaje peso/volumen.

#### COMPOSICIONES

##### *MEDIO LEV 1: LEVADURA DE CERVEZA 10 %*

- Levadura 10 g
- Agua destilada hasta 100 ml

##### *MEDIO LEV 2: LEVADURA DE CERVEZA 40 %*

- Levadura 40 g
- Agua destilada hasta 100 ml

##### *MEDIO LEV 3: LEVADURA DE CERVEZA 60 %*

- Levadura 60 g
- Agua destilada hasta 100 ml

#### PREPARACIÓN

Disolver los gramos pesados del medio en agua destilada y una vez bien disuelto llevar a un volumen de 100 ml con agua destilada, y homogeneizar nuevamente.

Leer el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 4.2. Medio de bagazo de cebada.

El bagazo como medio para el crecimiento en su forma natural sin ningún tratamiento previo, no se puede utilizar debido a su insolubilidad en agua, por lo que se prepara en forma de infusión y cocción y se realizan pruebas para determinar en cual de las dos formas se da un mejor crecimiento.

### 4.2.1. Infusión de bagazo de cebada.

Se prepara el medio en dos diferentes concentraciones en porcentaje peso/volumen.

#### COMPOSICIONES

##### *MEDIO BAG 1: BAGAZO DE CEBADA 10 %*

- Bagazo de cebada 10 g
- Agua destilada hasta 100 ml

##### *MEDIO BAG 2: BAGAZO DE CEBADA 20 %*

- Bagazo de cebada 20 g
- Agua destilada hasta 100 ml

#### PREPARACIÓN

Poner la cantidad pesada de bagazo dentro de una bolsa de gasa y colocarla en un recipiente con agua destilada caliente a 100 °C, tapar y dejar en infusión y reposo 10 min, retirar la bolsa de gasa presionarla con fuerza para escurrir el líquido absorbido, dejar enfriar la solución y llevar con agua destilada a un volumen de 100 ml. Realizar igual procedimiento con la otra muestra.

Medir el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 4.2.2. Cocción de bagazo de cebada.

Se prepara el medio en dos diferentes concentraciones en porcentaje peso/volumen.

#### COMPOSICIONES

##### *MEDIO BAG 3: BAGAZO DE CEBADA 10 %*

- Bagazo de cebada 10 g
- Agua destilada hasta 100 ml

**MEDIO BAG 4: BAGAZO DE CEBADA 20 %**

- Bagazo de cebada 20 g
- Agua destilada hasta 100 ml

**PREPARACIÓN**

Colocar dentro de una bolsa de gasa los gramos pesados, poner la bolsa en un recipiente con agua destilada caliente y someterla a cocción en un volumen de 100 ml de agua destilada durante 10 min, retirar la bolsa y presionar con fuerza para extraer el líquido absorbido, filtrar, enfriar y completar a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Realizar el mismo proceso anterior con la otra muestra.

Medir el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**4.3. Medio de germen de cebada.**

Al igual que el anterior, el germen de cebada sin ningún tratamiento previo no se lo puede utilizar por ser insoluble en agua, se lo prepara de igual forma, en infusión y en cocción.

**4.3.1. Infusión de germen de cebada.**

Se preparan el medio en dos diferentes concentraciones en porcentaje peso/volumen.

**COMPOSICIONES****MEDIO GER 1: GERMEN DE CEBADA 10 %**

- Germen de cebada 10 g
- Agua destilada hasta 100 ml

**MEDIO GER 2: GERMEN DE CEBADA 20 %**

- Germen de cebada 20 g
- Agua destilada hasta 100 ml

**PREPARACIÓN**

Poner la cantidad pesada de germen de cebada dentro de una bolsa de gasa y colocarla en un recipiente con agua destilada caliente, tapar y dejar en infusión y reposo por 10 min, presionar la bolsa de gasa para extraer el líquido absorbido por el germen, retirar, dejar enfriar la solución y llevar con agua destilada a un volumen de 100 ml.

Hacer igual procedimiento con la otra muestra.

Medir el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

#### **4.3.2. Cocción de germen de cebada.**

##### **COMPOSICIONES**

###### ***MEDIO GER 3: GERMEN DE CEBADA 10 %***

- Germen de cebada 10 g
- Agua destilada hasta 100 ml

###### ***MEDIO GER 4: GERMEN DE CEBADA 20 %***

- Germen de cebada 20 g
- Agua destilada hasta 100 ml

##### **PREPARACIÓN**

Colocar dentro de una bolsa de gasa los gramos pesados, poner la bolsa en un recipiente con agua destilada caliente y someterla a cocción en 100 ml de agua destilada durante 10 min, retirar la bolsa y presionarla con fuerza para extraer el líquido absorbido por el germen, filtrar, enfriar y completar hasta 100 ml con agua destilada.

Realizar el mismo proceso anterior con la otra muestra.

Medir el pH, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

#### **4.4. Medio de concentrado de zumo de manzana.**

Primero se realiza la medición de la concentración de los azúcares del concentrado de zumo de manzana o grados Brix, obteniéndose como resultado luego de hacer una dilución 1/10 (1 g de concentrado de zumo en 10 ml de agua destilada), 10 °Brix que equivalen a 854 g/l de azúcar.

Se preparan medios de cultivo en cuatro diferentes concentraciones en gramos de azúcar por litro de solución.

##### **COMPOSICIONES**

###### ***MEDIO MANZ 1: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 10 g/l de azúcar***

- Concentrado de zumo manzana 11,8 ml
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO MANZ 2: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 20 g /l de azúcar**

- Concentrado de zumo manzana 23,6 ml
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO MANZ 3: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 40 g /l de azúcar**

- Concentrado de zumo manzana 47,2 ml
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO MANZ 4: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 100 g /l de azúcar**

- Concentrado de zumo manzana 118 ml
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Medir cada uno de los volúmenes calculados de concentrado de zumo de manzana, adicionar las diferentes proporciones de agua destilada, agitar hasta completa disolución, completar el volumen y homogeneizar el medio.

Medir el pH, el cual debe estar entre 4 y 8, al ser inferior a 4 se modifica con la adición de gotas de una solución de NaOH 1N hasta llegar a un pH alrededor de 5.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**4.5. Medio de lactosuero.**

Según referencia bibliográfica (Sanderson y Reed, 1985; Moulin y Galzy, 1984; Reed y Nagodawithana, 1991) el lactosuero es una buena alternativa como medio de cultivo por su composición rica en nutrientes (apartado 6.6 de materiales), pero necesita una fuente adicional de carbono, nitrógeno y potasio (Madrid, 1981; Lee y Mattick, 1989).

Inicialmente se filtra para eliminar las impurezas sólidas y se prepara el medio de cultivo a diferentes concentraciones, pero se observa que al aumentar la concentración de lactosuero en el medio una vez esterilizado, aumenta la precipitación de la lactosa que permanece insolubilizado a elevadas concentraciones (80 %, 100 % de lactosuero).

Se prepara el medio en tres diferentes concentraciones en porcentaje volumen/volumen.

**COMPOSICIONES*****MEDIO LAC 1: LACTOSUERO 10 %***

- Lactosuero 10 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

***MEDIO LAC 2: LACTOSUERO 20 %***

- Lactosuero 20 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

***MEDIO LAC 3: LACTOSUERO 30 %***

- Lactosuero 30 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

***MEDIO LAC 4: LACTOSUERO 40 %***

- Lactosuero 40 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

***MEDIO LAC 5: LACTOSUERO 60 %***

- Lactosuero 60 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

***MEDIO LAC 6: LACTOSUERO 80 %***

- Lactosuero 80 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

**PREPARACIÓN**

Disolver cada medida del medio en agua destilada, y una vez bien disuelto llevar a un volumen de 100 ml con agua destilada, y homogeneizar nuevamente.

Leer el pH, esterilizar en autoclave a 110 °C durante 15 min.



#### 4.6. Medio derivado láctico.

Esta materia prima que se utiliza como medio de crecimiento, es el resultado de la evaporación del lactosuero que es la mezcla de todos los subproductos obtenidos durante el proceso de fabricación de quesos.

##### COMPOSICIONES

###### *MEDIO DER, LAC 1: DERIVADO LÁCTICO 20 %*

- Derivado láctico 20 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

###### *MEDIO DER, LAC 2: DERIVADO LÁCTICO 40 %*

- Derivado láctico 40 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

###### *MEDIO DER, LAC 3: DERIVADO LÁCTICO 60 %*

- Derivado láctico 60 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

###### *MEDIO DER, LAC 4: DERIVADO LÁCTICO 80 %*

- Derivado láctico 80 ml
- Agua destilada hasta 100 ml

##### PREPARACIÓN

Disolver cada una de las proporciones correspondientes del derivado láctico en agua destilada, y una vez bien disuelto llevar a un volumen de 100 ml con agua destilada, y homogeneizar nuevamente.

Leer el pH y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

#### 4.7. Medio de melazas de caña de azúcar.

La melaza de caña de azúcar es uno de los medios más utilizados a nivel de industrias de fermentaciones en la producción de levaduras, por su costo bajo y su gran riqueza nutritiva (apartado 6.8 de Materiales) (Beudeker *et al.*, 1989; Reed y Nagodawithana, 1991; Vitolo *et al.*, 1995).

La melaza de la caña de azúcar, debido a que posee muchos nutrientes necesarios para el

crecimiento de las levaduras, se utiliza como otro medio alternativo para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), ya que en su composición tiene azúcares, proteínas y aminoácidos como fuente de nitrógeno y minerales.

Se prepara el medio de cultivo en diferentes concentraciones en gramos por litro de disolución.

## COMPOSICIONES

### ***MEDIO MEL 1: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 5 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 5 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### ***MEDIO MEL 2: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 10 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### ***MEDIO MEL 3: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 20 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 20 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### ***MEDIO MEL 4: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### ***MEDIO MEL 5: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### ***MEDIO MEL 6: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### ***MEDIO MEL 7: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 60 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 60 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO MEL 8: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 200 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 200 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO MEL 9: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 630 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 630 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Para preparar el medio, primero se realizan varias lecturas en el refractómetro de diferentes concentraciones en g/l de soluciones de melaza, hasta llegar a determinar que la concentración de 630 g/l corresponde a los 30 °Brix. El referido medio de cultivo está recomendado por Reed y Nagodawithana (1991).

Pesar los gramos exactos de cada uno de los medios, adicionar agua destilada, disolver y luego completar el volumen hasta llegar a 1000 ml homogeneizar nuevamente. Leer el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**4.8. Medio de melaza de remolacha azucarera.**

La melaza de remolacha azucarera juntamente con la melaza de caña de azúcar son las materias primas más utilizadas como medio de cultivo para crecimiento de levaduras a nivel industrial (Reed y Nagodawithana, 1991). Su composición es rica en nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras. Se utiliza como otro medio alternativo para poder determinar si es igual o mejor que el medio de melaza de caña de azúcar en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Se prepara el medio de cultivo en diferentes concentraciones en gramos por litro de disolución.

**COMPOSICIONES****MEDIO REM 1: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 30 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 30 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO REM 2: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 40 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO REM 3: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO REM 4: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 80 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 80 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO REM 5: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 100 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 100 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Pesar los gramos exactos de cada uno de los medios, adicionar agua destilada, disolver y mezclar bien, luego completar el volumen hasta llegar a 1000 ml y homogeneizar nuevamente. Leer el pH y a continuación esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## **5. Medios de cultivo combinados para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

Los medios de cultivo combinados son el resultado de la mezcla en partes iguales de dos medios simples antes experimentados, se realizan varias combinaciones con medios simples a diferentes concentraciones para complementar nutritivamente los mismos y mejorar el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) .

## 5.1. Medio combinado de bagazo de cebada con levadura de cerveza.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO MEZCLA 1: BAGAZO DE CEBADA 10 % Y LEVADURA DE CERVEZA 5 %*

- Medio bagazo de cebada al 10 % 50 ml
- Medio levadura de cerveza 5 % 50 ml

#### *MEDIO MEZCLA 2: BAGAZO DE CEBADA 20 % Y LEVADURA DE CERVEZA 10 %*

- Medio bagazo de cebada al 20 % 50 ml
- Medio levadura de cerveza 10 % 50 ml

### PREPARACIÓN

Preparar la solución de bagazo de cebada al 10 y al 20 % por cocción, siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.2.2.

Preparar el medio de levadura de cerveza al 5 % y 10 % según la metodología del apartado 4.1.

Luego mezclar 50 ml del medio bagazo de cebada al 10 % con 50 ml de medio levadura de cerveza al 5 %, y para el otro medio 50 ml de bagazo de cebada 20 % con 50 ml de levadura de cerveza al 10 %, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 5.2. Medio combinado de germen de cebada con levadura de cerveza.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO MEZCLA 3: GERMEN DE CEBADA 10 % Y LEVADURA DE CERVEZA 10 %*

- Medio germen de cebada al 10 % 50 ml
- Medio de levadura de cerveza 10 % 50 ml

#### *MEDIO MEZCLA 4: GERMEN DE CEBADA 20 % Y LEVADURA DE CERVEZA 10 %*

- Medio germen de cebada al 20 % 50 ml
- Medio de levadura de cerveza 10 % 50 ml

**MEDIO MEZCLA 5: GERMEN DE CEBADA 10 % Y LEVADURA DE CERVEZA 40 %**

- Medio germen de cebada al 10 % 50 ml
- Medio de levadura de cerveza 40 % 50 ml

**MEDIO MEZCLA 6: GERMEN DE CEBADA 20 % Y LEVADURA DE CERVEZA 40 %**

- Medio germen de cebada al 20 % 50 ml
- Medio de levadura de cerveza 40 % 50 ml

**PREPARACIÓN**

Primero preparar el medio germen de cebada por infusión en las dos concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.3.1.

Preparar posteriormente el medio levadura de cerveza en diferentes concentraciones según se explica en el apartado 4.1.

Luego mezclar 50 ml del medio de germen de cebada en su respectiva concentración con 50 ml del medio de levadura de cerveza en la correspondiente concentración, según el medio que se desee preparar, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**5.3. Medio combinado concentrado de zumo de manzana con levadura de cerveza.****COMPOSICIÓN****MEDIO MEZCLA 7: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 25 g/l DE AZÚCAR Y LEVADURA DE CERVEZA 5 %**

- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 25 g/l de azúcar
- Medio levadura de cerveza 5 % 50 ml

**MEDIO MEZCLA 8: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 20 g/l DE AZÚCAR Y LEVADURA DE CERVEZA 10 %**

- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 20 g/l de azúcar
- Medio levadura de cerveza 10 % 50 ml

**MEDIO MEZCLA 9: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 40 g/l DE AZÚCAR Y LEVADURA DE CERVEZA 40 %**

- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 40 g/l de azúcar
- Medio levadura de cerveza 40 % 50 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de concentrado de zumo de manzana en diferentes concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.4.

Luego preparar el medio de levadura de cerveza siguiendo la metodología del apartado 4.1.

Mezclar 50 ml del medio concentrado de zumo de manzana de cada concentración con 50 ml del correspondiente medio de levadura de cerveza, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**5.4. Medio combinado concentrado de zumo de manzana con germen de cebada.**

**COMPOSICIÓN:**

**MEDIO MEZCLA 10: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 60 g/l DE AZÚCAR Y GERMEN DE CEBADA 10 %**

- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 60 g/l de azúcar
- Medio germen de cebada 10 % 50 ml

***MEDIO MEZCLA 11: CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 40 g/l DE AZÚCAR Y GERMEN DE CEBADA 20 %***

- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 40 g/l de azúcar
- Medio germen de cebada 20 % 50 ml

**PREPARACIÓN**

Primero se prepara el medio de concentrado de zumo de manzana en diferentes concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.4.

Luego preparar el medio de germen de cebada en las dos concentraciones por infusión siguiendo la metodología del apartado 4.3.1.

Mezclar 50 ml del medio concentrado de zumo de manzana de cada concentración de medio que se desea preparar con 50 ml de los dos correspondientes medios de germen de cebada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**5.5. Medio combinado lactosuero con levadura de cerveza.****COMPOSICIÓN:*****MEDIO MEZCLA 12: LACTOSUERO 40 % Y LEVADURA DE CERVEZA 20 %***

- Medio lactosuero 40 % 50 ml
- Medio levadura de cerveza 20 % 50 ml

***MEDIO MEZCLA 13: LACTOSUERO 40 % Y LEVADURA DE CERVEZA 40 %***

- Medio lactosuero 40 % 50 ml
- Medio levadura de cerveza 40 % 50 ml

***MEDIO MEZCLA 14: LACTOSUERO 60 % Y LEVADURA DE CERVEZA 20 %***

- Medio lactosuero 60 % 50 ml
- Medio levadura de cerveza 20 % 50 ml

***MEDIO MEZCLA 15: LACTOSUERO 60 % Y LEVADURA DE CERVEZA 40 %***

- Medio lactosuero 60 % 50 ml
- Medio levadura de cerveza 40 % 50 ml



## PREPARACIÓN

Primero se prepara el medio lactosuero en diferentes concentraciones siguiendo la metodología del apartado 4.5.

Luego se prepara el medio de levadura de cerveza en las diferentes concentraciones según la metodología explicada en el apartado 4.1.

Mezclar 50 ml de cada medio de lactosuero con 50 ml del correspondiente medio de levadura de cerveza, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 5.6. Medio combinado lactosuero con concentrado de zumo de manzana.

#### COMPOSICIÓN

##### ***MEDIO MEZCLA 16: LACTOSUERO 5 % Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 25 g/l DE AZÚCAR***

- Medio de lactosuero 5 % 50 ml
  - Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 25 g/l de azúcar

##### ***MEDIO MEZCLA 17: LACTOSUERO 10 % Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 20 g/l DE AZÚCAR***

- Medio de lactosuero 10 % 50 ml
  - Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 20 g/l de azúcar

##### ***MEDIO MEZCLA 18: LACTOSUERO 40 % Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 40 g/l DE AZÚCAR***

- Medio de lactosuero 40 % 50 ml
  - Medio concentrado zumo de manzana 50 ml
- 40 g/l de azúcar



**MEDIO MEZCLA 19: LACTOSUERO 30 % Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA  
20 g/l DE AZÚCAR**

- Medio de lactosuero 30 % 50 ml
- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml

20 g/l de azúcar

**MEDIO MEZCLA 20: LACTOSUERO 40 % Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA  
20 g/l DE AZÚCAR**

- Medio de lactosuero 40 % 50 ml
- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml

20 g/l de azúcar

**MEDIO MEZCLA 21: LACTOSUERO 60 % Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA  
40 g/l DE AZÚCAR**

- Medio de lactosuero 60 % 50 ml
- Medio concentrado zumo de manzana 50 ml

40 g/l de azúcar

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de lactosuero en diferentes concentraciones, siguiendo la metodología del apartado 4.5.

Luego preparar el medio de concentrado de zumo de manzana siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.4.

Preparar cada uno de los medios combinados mezclando 50 ml de cada medio de lactosuero con 50 ml de los correspondientes medios de concentrado de zumo de manzana, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 5.7. Medio combinado lactosuero con germen de cebada.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO MEZCLA 22: LACTOSUERO 20 % Y GERMEN DE CEBADA 10 %*

- Medio de lactosuero 20 % 50 ml
- Medio germen de cebada 10 % 50 ml

#### *MEDIO MEZCLA 23: LACTOSUERO 40 % Y GERMEN DE CEBADA 20 %*

- Medio de lactosuero 40 % 50 ml
- Medio germen de cebada 20 % 50 ml

### PREPARACIÓN

Preparar el medio de lactosuero en las dos concentraciones, siguiendo la metodología del apartado 4.5.

Luego preparar el medio germen de cebada por infusión siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.3.1.

Preparar cada uno de los medios combinados mezclando 50 ml de cada medio de lactosuero con 50 ml de su correspondiente medio germen de cebada, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 5.8. Medio combinado melaza de caña de azúcar con levadura de cerveza.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO MEZCLA 24: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y LEVADURA DE CERVEZA 10 %*

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l 50 ml
- Medio levadura de cerveza 10 % 50 ml

#### *MEDIO MEZCLA 25: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y LEVADURA DE CERVEZA 40 %*

- Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l 50 ml
- Medio levadura de cerveza 40 % 50 ml

## PREPARACIÓN

Primero se prepara el medio melaza de caña de azúcar en las dos concentraciones, siguiendo la metodología del apartado 4.7.

Luego preparar el medio levadura de cerveza en dos concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.1.

Luego se procede a mezclar 50 ml de cada medio de melaza de caña de azúcar a las diferentes concentraciones con 50 ml de su correspondiente medio levadura de cerveza, se homogeneiza y mide el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 5.9. Medio combinado melaza de caña de azúcar con bagazo de cebada.

#### COMPOSICIÓN

##### *MEDIO MEZCLA 26: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y BAGAZO DE CEBADA 10 %*

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l                      50 ml
- Medio bagazo de cebada 10 %                                      50 ml

##### *MEDIO MEZCLA 27: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y BAGAZO DE CEBADA 20 %*

- Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l                      50 ml
- Medio bagazo de cebada 20 %                                      50 ml

#### PREPARACIÓN

Primero se prepara el medio melaza de caña de azúcar en las dos concentraciones, siguiendo la metodología del apartado 4.7.

Luego preparar el medio bagazo de cebada por cocción en dos concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.2.2.

Mezclar 50 ml de cada medio de melaza de caña de azúcar en sus dos concentraciones con 50 ml de su correspondiente medio bagazo de cebada, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 5.10. Medio combinado melaza de caña de azúcar con germen de cebada.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO MEZCLA 28: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y GERMEN DE CEBADA 10 %*

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l                      50 ml
- Medio bagazo de cebada 10 %                                      50 ml

#### *MEDIO MEZCLA 29: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y GERMEN DE CEBADA 20 %*

- Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l                      50 ml
- Medio bagazo de cebada 20 %                                      50 ml

### PREPARACIÓN

Se prepara el medio melaza de caña de azúcar en dos concentraciones, siguiendo la metodología del apartado 4.7.

Luego se prepara el medio germen de cebada por infusión en dos concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.3.1.

Mezclar 50 ml de cada medio de melaza de caña de azúcar con 50 ml de su correspondiente medio germen de cebada, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 5.11. Medio combinado melaza de caña de azúcar con concentrado de zumo de manzana.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO MEZCLA 30: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 20 g/l DE AZÚCAR*

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l                      50 ml
- Medio concentrado zumo de manzana                      50 ml

20 g/l de azúcar

**MEDIO MEZCLA 31: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y CONCENTRADO DE ZUMO DE MANZANA 40 g/l AZÚCAR**

- Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l                      50 ml
  - Medio concentrado zumo de manzana                      50 ml
- 40 g/l de azúcar

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio melaza de caña de azúcar en dos concentraciones, siguiendo la metodología del apartado 4.7.

Luego se prepara el medio concentrado de zumo de manzana en dos concentraciones siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.4.

Mezclar 50 ml de cada medio de melaza de caña de azúcar con 50 ml de su correspondiente medio concentrado de zumo de manzana, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**5.12. Medio combinado melaza de caña de azúcar con lactosuero.****COMPOSICIÓN****MEDIO MEZCLA 32: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y LACTOSUERO 40 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l                      50 ml
- Medio lactosuero 40 %    50 ml

**MEDIO MEZCLA 33: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 20 g/l Y LACTOSUERO 30 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 20 g/l                      50 ml
- Medio lactosuero 30 %    50 ml

**MEDIO MEZCLA 34: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y LACTOSUERO 40 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l                      50 ml
- Medio lactosuero 40 %    50 ml

**MEDIO MEZCLA 35: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 60 g/l Y LACTOSUERO 10 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 60 g/l                      50 ml
- Medio lactosuero 10 %    50 ml

**MEDIO MEZCLA 36: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 60 g/l Y LACTOSUERO 40 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 60 g/l                      50 ml
- Medio lactosuero 40 %    50 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar las diferentes concentraciones de medio melaza de caña de azúcar, siguiendo la metodología del apartado 4.7.

Luego se prepara el medio lactosuero en sus diferentes concentraciones, siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.5.

Mezclar 50 ml de cada concentración de medio de melaza de caña de azúcar con 50 ml de su correspondiente concentración de medio lactosuero, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**5.13. Medio combinado melaza de caña de azúcar con derivado láctico.****COMPOSICIÓN****MEDIO MEZCLA 37: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y DERIVADO LÁCTICO 20 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l                      50 ml
- Medio derivado láctico 20 %                                      50 ml

**MEDIO MEZCLA 38: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y DERIVADO LÁCTICO 20 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l                      50 ml
- Medio derivado láctico 20 %                                      50 ml

**MEDIO MEZCLA 39: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l Y DERIVADO LÁCTICO 40 %**

- Medio melaza de caña de azúcar 10 g/l                      50 ml
- Medio derivado láctico 40 %                                      50 ml





- Fosfato dihidrógeno de potasio 0,8 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### PREPARACIÓN

Tomar 23,5 ml de concentrado de zumo de manzana que es el volumen calculado en base a la concentración de azúcar determinado por la medición de los grados Brix del concentrado, y añadir 4 g de sulfato de amonio, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, y medir el pH.

El segundo medio preparar con las mismas cantidades de concentrado de zumo de manzana y sulfato de amonio, añadir 0,8 g de fosfato dihidrógeno de potasio, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 6.2. Medio lactosuero enriquecido con sulfato de amonio o con sulfato de amonio y fosfato dihidrógeno de potasio.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO ENR 3: LACTOSUERO 20 % Y SULFATO DE AMONIO 2 g/l*

- Lactosuero 200 ml
- Sulfato de amonio 2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

#### *MEDIO ENR 4: LACTOSUERO 10 %, SULFATO DE AMONIO 2 g/l Y FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO 0,4 g/l*

- Lactosuero 100 ml
- Sulfato de amonio 2 g
- Fosfato dihidrógeno de potasio 0,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 5: LACTOSUERO 20 %, SULFATO DE AMONIO 2 g/l Y FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO 0,4 g/l**

- Lactosuero 200 ml
- Sulfato de amonio 2 g
- Fosfato dihidrógeno de potasio 0,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Tomar el volumen correspondiente de lactosuero según el medio que se va a preparar, añadir 2 g de sulfato de amonio, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, medir el pH.

En el segundo y tercer medio medir el volumen correspondiente de lactosuero, añadir 2 g de sulfato de amonio, y 0,4 g de fosfato dihidrógeno de potasio a cada uno, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.3. Medio lactosuero enriquecido con glucosa.****COMPOSICIÓN****MEDIO ENR 6: LACTOSUERO 40 % Y GLUCOSA 1 %**

- Lactosuero 400 ml
- Glucosa 10 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 7: LACTOSUERO 40 % Y GLUCOSA 1,5 %**

- Lactosuero 400 ml
- Glucosa 15 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 8: LACTOSUERO 40 % Y GLUCOSA 2 %**

- Lactosuero 400 ml
- Glucosa 20 g

- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 9: LACTOSUERO 60 % Y GLUCOSA 2 %**

- Lactosuero 600 ml
- Glucosa 20 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 10: LACTOSUERO 60 % Y GLUCOSA 1 %**

- Lactosuero 600 ml
- Glucosa 10 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Tomar el volumen de lactosuero según el medio que se va a preparar, añadir a cada medio la cantidad correspondiente de glucosa, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.4. Medio derivado láctico enriquecido con glucosa.**

**COMPOSICIÓN**

**MEDIO ENR 11: DERIVADO LÁCTICO 40 % Y GLUCOSA 1 %**

- Derivado láctico 400 ml
- Glucosa 10 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 12: DERIVADO LÁCTICO 40 % Y GLUCOSA 1,5 %**

- Derivado láctico 400 ml
- Glucosa 15 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 13: DERIVADO LÁCTICO 60 % Y GLUCOSA 2 %**

- Derivado láctico 600 ml
- Glucosa 20 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Medir el volumen de lactosuero según el medio que se va a preparar, añadir a cada volumen la cantidad correspondiente de glucosa, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.5. Medio melaza de caña de azúcar enriquecido con urea a diferentes concentraciones.****6.5.1. Medio melaza de caña de azúcar 30 g/l y urea a diferentes concentraciones.****COMPOSICIONES****MEDIO ENR 14: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y UREA 0,3 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Urea 0,3 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 15: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y UREA 0,6 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Urea 0,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 16: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y UREA 1,2 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 17: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y UREA 2,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Urea 2,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 18: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y UREA 4,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Urea 4,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 19: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y UREA 6,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Urea 6,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Prepara la solución de melaza de caña de azúcar 30 g/l siguiendo la metodología del apartado 4.7, luego adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y llevar a un volumen de 1000 ml la solución con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.5.2. Medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea a diferentes concentraciones.****COMPOSICIONES****MEDIO ENR 20: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 0,3 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 0,3 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 21: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 0,6 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 0,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 22: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 1,2 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 23: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 2,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 2,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 24: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 4,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 4,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 25: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 6,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 6,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Prepara la solución de melaza 40 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.7, luego adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a

un volumen de 1000 ml la solución con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 6.5.3. Medio melaza de caña de azúcar 50 g/l y urea a diferentes concentraciones.

#### COMPOSICIONES

##### *MEDIO ENR 26: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y UREA 0,3 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 0,3 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 27: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y UREA 0,6 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 0,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 28: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y UREA 1,2 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 29: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y UREA 2,0 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 2,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 30: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y UREA 4,0 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 4,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 31: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y UREA 6,0 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 6,0 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Prepara la solución de melaza 50 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.7, luego adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.6. Medio melaza de caña de azúcar enriquecido con sulfato de amonio a diferentes concentraciones.**

Se utiliza el sulfato de amonio como segunda fuente de nitrógeno, para lo cual, se preparan medios de cultivo en varias concentraciones de melaza y sulfato de amonio, hasta llegar a determinar la composición en concentración mas adecuada de los dos componentes para obtener un mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

**6.6.1. Medio melaza de caña de azúcar y sulfato de amonio 20 mM (2,65 g/l).****COMPOSICIONES****MEDIO ENR 32: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y SULFATO DE AMONIO 2,65 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Sulfato de amonio 2,65 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 33: MELAZA CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y SULFATO DE AMONIO 2,65 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Sulfato de amonio 2,65 g
- Agua destilada hasta 1000 ml



**MEDIO ENR 34: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y SULFATO DE AMONIO 2,65 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Sulfato de amonio 2,65 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Pesar la cantidad correspondiente de melaza de caña de azúcar, según la metodología explicada en el apartado 4.7, adicionar a cada medio 2,65 g de la sal sulfato de amonio, peso que corresponde a una solución de sulfato de amonio 20 mM; concentración recomendada por Usall (1995) como la óptima para un mejor crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1). Disolver bien y completar el volumen a 1000 ml con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.6.2. Medio melaza de caña de azúcar y sulfato de amonio 4 g/l.**

**COMPOSICIONES**

**MEDIO ENR 35: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l Y SULFATO DE AMONIO 4 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Sulfato de amonio 4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 36: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y SULFATO DE AMONIO 4 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Sulfato de amonio 4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 37: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l Y SULFATO DE AMONIO 4 g/l**

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Sulfato de amonio 4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

## PREPARACIÓN

Pesar la cantidad correspondiente de melaza, según la metodología explicada en el apartado 4.7, adicionar a cada medio 4 g de la sal sulfato de amonio. Disolver bien y completar el volumen a 1000 ml con agua destilada, medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### 6.7. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con vitaminas.

#### COMPOSICIONES

**MEDIO ENR 38: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l, UREA 1,2 g/l, BIOTINA 20 mg/l Y PIRIDOXINA 400 mg/l**

- |                            |               |
|----------------------------|---------------|
| • Melaza de caña de azúcar | 40 g          |
| • Urea                     | 1,2 g         |
| • Biotina                  | 20 mg (20 mM) |
| • Piridoxina               | 400 mg        |
| • Agua destilada           | hasta 1000 ml |

**MEDIO ENR 39: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l, UREA 1,2 g/l, BIOTINA 20 mg/l Y PIRIDOXINA 400 mg/l**

- |                            |               |
|----------------------------|---------------|
| • Melaza de caña de azúcar | 50 g          |
| • Urea                     | 1,2 g         |
| • Biotina                  | 20 mg (20 mM) |
| • Piridoxina               | 400 mg        |
| • Agua destilada           | hasta 1000 ml |

## PREPARACIÓN

Preparar el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l siguiendo la metodología del medio ENR 22 explicada en el apartado 6.5.2 y el medio melaza de caña de azúcar 50 g/l y urea 1,2 g/l, siguiendo la metodología del medio ENR 28 explicada en el apartado 6.5.3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Preparar la disolución de biotina, disolviendo el peso especificado en 20 ml de agua destilada, que corresponde a una solución 20 mM, recomendada como la óptima para el crecimiento de la cepa

*C. sake* (CPA-1) por Usall (1995), y esterilizar por filtración, aparte y de la misma manera, en 20 ml de agua destilada preparar la disolución de piridoxina, esterilizar por filtración.

Los 20 ml correspondientes de biotina y piridoxina adicionar a cada medio esterilizado de melaza de caña de azúcar y urea, completar el volumen a un litro con agua destilada estéril, homogeneizar bien y medir el pH.

## 6.8. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con biotina.

### COMPOSICIONES

**MEDIO ENR 40: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l, CON UREA 1,2 g/l Y BIOTINA 20 mg/l**

- |                            |               |
|----------------------------|---------------|
| • Melaza de caña de azúcar | 40 g          |
| • Urea                     | 1,2 g (20 mM) |
| • Biotina                  | 20 mg (20 mM) |
| • Agua destilada           | hasta 1000 ml |

**MEDIO ENR 41: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l, CON UREA 1,2 g/l Y BIOTINA 20 mg/l**

- |                            |               |
|----------------------------|---------------|
| • Melaza de caña de azúcar | 50 g          |
| • Urea                     | 1,2 g (20 mM) |
| • Biotina                  | 20 mg (20 mM) |
| • Agua destilada           | hasta 1000 ml |

### PREPARACIÓN

Preparar el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l siguiendo la metodología del medio ENR 22 explicada en el apartado 6.5.2 y el medio melaza de caña de azúcar 50 g/l y urea 1,2 g/l, siguiendo la metodología del medio ENR 28 explicada en el apartado 6.5.3. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Aparte, preparar la solución de biotina, siguiendo la metodología detallada en el apartado 6.7 y adicionar bajo condiciones asépticas 20 ml de solución de biotina a la solución ya estéril de melaza y urea, homogeneizar bien y completar a un volumen de 1000 ml con agua destilada, medir el pH.

## 6.9. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con sales de manganeso y cobre.

Para un litro de solución.

### COMPOSICIONES

**MEDIO ENR 42: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l, CON UREA 1,2 g/l, SULFATO DE MANGANESO 303 mg/l Y SULFATO DE COBRE 40 mg/l**

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Sulfato de manganeso monohidratado 303 mg
- Sulfato de cobre pentahidratado 40 mg
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 43: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l, CON UREA 1,2 g/l, SULFATO DE MANGANESO 303 mg/l Y SULFATO DE COBRE 40 mg/l**

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Sulfato de manganeso monohidratado 303 mg
- Sulfato de cobre pentahidratado 40 mg
- Agua destilada hasta 1000 ml

### PREPARACIÓN

Preparar los medios melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l y melaza de caña de azúcar 50 g/l y urea 1,2 g/l, siguiendo las metodologías explicadas en los apartados 6.5.2 y 6.5.3 respectivamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Preparar una solución de sulfato de manganeso, disolviendo en 20 ml de agua destilada el peso especificado, que corresponde a una solución 20 mM, recomendada como la óptima para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) por Usall (1995) y esterilizar por filtración, aparte y de la misma manera, preparar la solución de sulfato de cobre, disolviendo en 20 ml de agua destilada el peso de la sal correspondiente y esterilizar por filtración.

Adicionar a cada medio esterilizado de melaza de caña de azúcar y urea los 20 ml de la solución de

la sal de manganeso y los 20 ml de la solución de la sal de cobre en condiciones asépticas.

Antes de utilizar completar la solución con los nutrientes a un volumen de 1000 ml con agua destilada estéril, homogeneizar y medir el pH.

### **6.10. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con biotina, sales de manganeso y cobre.**

Para un litro de solución.

#### **COMPOSICIONES**

***MEDIO ENR 44: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l, CON UREA 1,2 g/l, BIOTINA 20 mg/l, SULFATO DE MANGANESO 303 mg/l Y SULFATO DE COBRE 40 mg/l***

- Melaza de caña de azúcar 40 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Biotina 20 mg/l
- Sulfato de manganeso monohidratado 303 mg
- Sulfato de cobre pentahidratado 40 mg
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 45: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 50 g/l, CON UREA 1,2 g/l, BIOTINA 20 mg/l, SULFATO DE MANGANESO 303 mg/l Y SULFATO DE COBRE 40 mg/l***

- Melaza de caña de azúcar 50 g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Biotina 20 mg
- Sulfato de manganeso monohidratado 303 mg (20 mM)
- Sulfato de cobre pentahidratado 40 mg
- Agua destilada hasta 1000 ml

#### **PREPARACIÓN**

Preparar los medios melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l y melaza de caña de azúcar 50 g/l y urea 1,2 g/l, siguiendo las metodología explicadas en los apartados 6.5.2 y 6.5.3 respectivamente, Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Preparar una solución de sulfato de manganeso, disolviendo en 20 ml de agua destilada el peso especificado, que corresponde a una solución 20 mM, recomendada como la óptima para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) por Usall (1995), y esterilizar por filtración. Aparte y de la misma manera, preparar la solución de sulfato de cobre disolviendo en 20 ml de agua destilada el peso que corresponde y esterilizar por filtración.

Adicionar a cada medio esterilizado de melaza de caña de azúcar y urea, los 20 ml de la solución de la sal de manganeso y los 20 ml de la solución de la sal de cobre en condiciones asépticas, homogeneizar bien.

Aparte, preparar la solución de biotina, siguiendo la metodología del apartado 6.7 y adicionar bajo las mismas condiciones asépticas los 20 ml de biotina a la solución estéril de melaza con urea, manganeso y cobre, homogeneizar bien, antes de utilizar completar a un volumen de 1000 ml con agua destilada estéril, medir el pH.

### **6.11. Medio melaza de caña de azúcar y urea enriquecido con fosfato dihidrógeno de potasio.**

#### **COMPOSICIONES**

Para 1000 ml de solución

***MEDIO ENR 46: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l, CON UREA 1,2 g/l Y FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO 0,04 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 40g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Fosfato dihidrógeno de potasio 0,04 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 47: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l, CON UREA 1,2 g/l Y FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO 0,08 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 40g
- Urea 1,2 g (20 mM)
- Fosfato dihidrógeno de potasio 0,08 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

## PREPARACIÓN

Preparar el medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 6.5.2, adicionar a cada medio 0,04 y 0,08 g de fosfato dihidrógeno de potasio, disolver en agua destilada y homogeneizar bien, adicionar el volumen que falta para llegar a 1000 ml, leer el pH del medio.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 6.12. Medio melaza de remolacha azucarera enriquecido con urea como fuente de nitrógeno.

Se realizan pruebas de crecimiento con urea como otra fuente de nitrógeno.

### 6.12.1. Medio melaza de remolacha azucarera 30 g/l y urea en diferentes concentraciones.

#### COMPOSICIONES

##### *MEDIO ENR 48: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 30 g/l Y UREA 0,6 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 30 g
- Urea 0,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 49: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 30 g/l Y UREA 1,2 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 30 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 50: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 30 g/l Y UREA 2,4 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 30 g
- Urea 2,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

## PREPARACIÓN

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 30 g/l siguiendo la metodología explicada en el

apartado 4.8, adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de gramos de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

#### **6.12.2. Medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea en diferentes concentraciones.**

##### **COMPOSICIONES**

##### ***MEDIO ENR 51: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 0,6 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 40 g
- Urea 0,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### ***MEDIO ENR 52: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 40 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### ***MEDIO ENR 53: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 2,4 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 40 g
- Urea 2,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### **PREPARACIÓN**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l según la metodología explicada en el apartado 4.8, adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.



### 6.12.3. Medio melaza de remolacha azucarera 50 g/l y urea en diferentes concentraciones.

#### COMPOSICIONES

##### *MEDIO ENR 54: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l Y UREA 0,25 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Urea 0,25 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 55: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l Y UREA 0,5 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Urea 0,5 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 56: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l Y UREA 0,6 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Urea 0,6g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 57: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l Y UREA 0,75 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Urea 0,75 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### *MEDIO ENR 58: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l Y UREA 1,2 g/l*

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 59: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 50 g/l Y UREA 2,4 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 50 g
- Urea 2,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 50 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.8, adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, homogeneizar y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.12.4. Medio melaza de remolacha azucarera 60 g/l y urea en diferentes concentraciones.****COMPOSICIONES*****MEDIO ENR 60: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 60 g/l Y UREA 0,25 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 60 g
- Urea 0,25 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 61: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 60 g/l Y UREA 0,5 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 60 g
- Urea 0,5 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 62: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 60 g/l Y UREA 0,75 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 60 g
- Urea 0,75 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 63: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 60 g/l Y UREA 1,2 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 60 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 60 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.8, luego adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, nuevamente homogeneizar, y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.12.5. Medio de melaza de remolacha azucarera 70 g/l y urea en diferentes concentraciones.****COMPOSICIONES****MEDIO ENR 64: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 70 g/l Y UREA 0,25 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 70 g
- Urea 0,25 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 65: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 70 g/l Y UREA 0,50 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 70 g
- Urea 0,50 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 66: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 70 g/l Y UREA 0,75 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 70 g
- Urea 0,75 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 67: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 70 g/l Y UREA 1,2 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 70 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 68: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 70 g/l Y UREA 2,4 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 70 g
- Urea 2,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

***MEDIO ENR 69: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 70 g/l Y UREA 3,6 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 70 g
- Urea 3,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 70 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.8, adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

**6.12.6. Medio melaza de remolacha azucarera 90 g/l y urea en diferentes concentraciones.****COMPOSICIONES*****MEDIO ENR 70: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 90 g/l Y UREA 1,2 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 90 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 71: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 90 g/l Y UREA 2,4 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 90 g
- Urea 2,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 72: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 90 g/l Y UREA 3,6 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 90 g
- Urea 3,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 90 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.8, adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien y completar a 1000 ml la solución con agua destilada, homogeneizar nuevamente y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 110 °C durante 15 min, para evitar la caramelización del medio.

**6.12.7. Medio melaza de remolacha azucarera 110 g/l y urea en diferentes concentraciones.****COMPOSICIONES****MEDIO ENR 73: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 110 g/l Y UREA 1,2 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 110 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 74: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 110 g/l Y UREA 2,4 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 110 g
- Urea 2,4 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**MEDIO ENR 75: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 110 g/l Y UREA 3,6 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 110 g
- Urea (20 mM) 3,6 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera 110 g/l siguiendo la metodología explicada en el apartado 4.8, adicionar a cada uno de los medios la cantidad correspondiente de urea, disolver bien, completar a 1000 ml la solución con agua destilada y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 110 °C durante 15 min, para evitar que se caramelize el medio.

**6.13. Medio melaza de remolacha azucarera enriquecido con sulfato de amonio en diferentes concentraciones.**

Preparar el medio de melaza de remolacha azucarera con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, con diferentes grados de pureza para determinar si influye en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

**COMPOSICIÓN****MEDIO ENR 76: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y SULFATO DE AMONIO 2,65 g/l**

- Melaza de remolacha azucarera 40 g
- Sulfato de amonio 2,65 g (20 mM)
- Agua destilada hasta 1000 ml

**PREPARACIÓN**

Pesar 40 g de melaza de remolacha azucarera, adicionar 2,65 g de sulfato de amonio. Disolver bien, completar el volumen a 1000 ml con agua destilada y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

#### 6.14. Medios combinados enriquecidos de melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera con urea.

##### COMPOSICIONES

*MEDIO ENR 77: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 20 g/l, MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 20 g/l Y UREA 1,2 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 20 g
- Melaza de remolacha azucarera 20 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

*MEDIO ENR 78: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 10 g/l, MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 30 g/l Y UREA 1,2 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 10 g
- Melaza de remolacha azucarera 30 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

*MEDIO ENR 79: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 30 g/l, MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 10 g/l Y UREA 1,2 g/l*

- Melaza de caña de azúcar 30 g
- Melaza de remolacha azucarera 10 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

##### PREPARACIÓN

Pesar los gramos de melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera correspondientes a cada medio, adicionar a cada uno 1,2 g de urea, disolver bien, completar el volumen a 1000 ml con agua destilada y medir el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

## 7. Medios de cultivo con pH modificados.

### 7.1. NYDB con pH modificado.

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 1: NYDB pH MODIFICADO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO E HIDRÓXIDO DE SODIO 1N*

- Ácido clorhídrico 1 N
- Hidróxido de sodio 1 N
- Hidróxido de sodio 6 N

#### MEDIO NYDB

- Caldo nutritivo 8 g
- Extracto de levadura 5 g
- Glucosa 10 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

#### PREPARACIÓN

Mezclar los componentes del medio en la cantidad de agua correspondiente, disolver bien y leer el pH.

Repartir 100 ml del medio preparado en matraces Erlenmeyer y a cada uno modificar su pH a valores de 4, 5, 6 y 7 adicionando gota a gota una solución de HCl 1 N, con homogeneización y periódica lectura de su pH.

Igual procedimiento hacer para preparar medios con pH 8, 9, 10, pero adicionando en este caso gota a gota una solución de NaOH 1 N.

Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Los valores aproximados de las soluciones utilizadas para modificar el pH, se detallan en la Tabla 14.



Tabla 14: Valores aproximados de solución de NaOH 1N y de HCl 1 N necesarios para modificar el pH del NYDB.

MEDIO NYDB (ml)	pH MODIFICADO	Na OH 1N (ml)	HCl 1N (ml)
100 ml	3		0,66
100 ml	4		0,25
100 ml	5		0,17
100 ml	6		0,11
100 ml	7	0,01	
100 ml	8	0,09	
*100 ml	9	*0,21	

\*Se adiciona para modificar el pH solución de NaOH 6 N

## 7.2. Medio mínimo salino pH modificado con ácidos bases y sales.

### 7.2.1. Medio mínimo salino modificando su pH con ácido clorhídrico y con hidróxido de sodio.

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 2: MEDIO MÍNIMO SALINO MODIFICADO SU pH CON ÁCIDO CLORHÍDRICO 1 N Y CON HIDRÓXIDO DE SODIO 1 N*

Preparar primero el medio mínimo salino, utilizando las mismas cantidades especificadas en el apartado 3.1 para un litro de solución, bajo condiciones asépticas.

Para modificar el pH de cada solución, se utilizan:

- Hidróxido de sodio 1 N
- Ácido clorhídrico 1 N

Autoclavar las dos soluciones a 121 °C durante 15 min.

#### PREPARACIÓN

El pH del medio mínimo salino preparado está entre 5,7 a 5,9.

Aparte tomar una alícuota de 10 ml del medio mínimo e ir adicionando gota a gota la solución de ácido clorhídrico, tras constante agitación lectura del pH, continuar con el proceso hasta llegar a pH

3, 4, y 5, o a un valor lo más aproximado posible.

Igual proceso realizar para soluciones con pH 6, 7, y 8 pero con la adición de gotas de solución de NaOH 1 N.

En base a los resultados obtenidos, calcular el volumen que se necesita adicionar para modificar 100 ml de medio mínimo a los diferentes pH.

Colocar 100 ml del medio mínimo salino estéril en matraces Erlenmeyer autoclavados y adicionar en condiciones asépticas en cada uno la cantidad calculada para cada pH, homogeneizar bien, leer el pH y si es necesario hacer un pequeño ajuste hasta obtener valores lo más cercanos a los requeridos.

En el caso de soluciones pH 8 y 9, se modifica el pH con solución de NaOH 6 N para que el volumen que se adiciona no sea elevado.

Los valores de solución de NaOH y HCl 1 N utilizados se detallan en la Tabla 15 para cada pH.

**Tabla 15: Valores aproximados de solución de NaOH 1N y de HCl 1N necesarios para modificar el pH del medio mínimo salino.**

MEDIO MÍNIMO (ml)	pH MODIFICADO	Na OH 1 N (ml)	HCl 1 N (ml)
100 ml	3		0,350
100 ml	4		0,10
100 ml	5		0,050
100 ml	6	0,3	
100 ml	7	2,4	
*100 ml	8	*0,3	
*100 ml	9	*1,0	

\*Se adiciona para modificar el pH solución de NaOH 6 N

### **7.2.2. Medio mínimo salino modificado su pH con ácido cítrico y con fosfato hidrógeno de sodio.**

#### **COMPOSICIÓN**

#### ***MEDIO pH MOD 3: MEDIO MÍNIMO SALINO CON SU pH MODIFICADO CON ÁCIDO CÍTRICO/FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO***

Prepara el medio mínimo salino, utilizado las cantidades especificadas en el apartado 3.1 para un litro de solución, pero en lugar de disolverlo en 1000 ml, solo disolverlo en 700 ml con agua

destilada estéril, es decir que el medio obtenido es más concentrado.

Para modificar el pH de cada medio mínimo, se utilizan:

Ácido cítrico

Fosfato hidrógeno de sodio

## PREPARACIÓN

Para 100 ml de cada solución a diferentes pH.

El pH del medio mínimo salino preparado está entre 5,7 e 5,9.

Tomar una alícuota de 30 ml de agua destilada, a la cual se incorpora las cantidades de las dos sales tanto de ácido cítrico como de fosfato hidrógeno de sodio calculadas tomando como referencia los valores detallados en las tablas del libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986) donde se encuentran los gramos necesarios para preparar soluciones de ácido cítrico 0,1 M y de fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M, disolver bien. Esterilizar estas soluciones por filtración y luego incorporarlos a los 70 ml de medio mínimo salino, preparado siguiendo la metodología del apartado 3.1 y que se encuentra también esterilizado, leer el pH, ajustar si es necesario poniendo pequeñas cantidades de una de las dos sales, previamente esterilizados por filtración según el pH que se esté preparando, de igual forma hacer con los otros pH hasta llegar a valores lo más aproximados.

En el caso del medio con pH 9, se modifica el mismo con la solución explicada en el apartado 7.3.1 formado por una mezcla de 0,751 g de glicina y 0,585 g de NaCl aforado a 100 ml y 4 ml de una solución de NaOH 1M esterilizada por filtración.

Los gramos aproximados de ácido cítrico y de fosfato hidrógeno de sodio que se disolverán en los 30 ml de agua destilada, se detallan en la Tabla 16 para cada pH.

Tabla 16: Pesos aproximados en gramos de ácido cítrico y de fosfato hidrógeno de sodio necesarios para modificar el pH del medio mínimo salino.

MEDIO MÍNIMO (ml)	pH MODIFICADO	g $C_6H_8O_7$ EN 30 ml DE $H_2O$	g $Na_2HPO_4$ EN 30 ml DE $H_2O$
70 ml	3	1,56	0,59
70 ml	4	1,26	1,20
70 ml	5	1,00	1,57
70 ml	6	0,70	1,85
70 ml	7	0,32	2,60
70 ml	8	0,05	3,30
70 ml	9	1,00	

### 7.3. NYDB pH modificado con ácido cítrico y fosfato hidrógeno de sodio.

En base a la metodología explicada en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986) se preparan las soluciones tamponantes.

Aparte pesar todos los componentes del medio NYDB necesarios para 100 ml de solución, que son:

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 4: MEDIO NYDB CON pH MODIFICADO CON ÁCIDO CÍTRICO/FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO*

##### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Ácido cítrico 0,1 M
- Fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M

##### NYDB

- Caldo nutritivo 0,8 g
- Extracto de levadura 0,5 g
- Glucosa 1,0 g
- Agua destilada hasta llegar a un volumen de 1000 ml

## PREPARACIÓN

A cada uno de los matraces Erlenmeyer que contienen las cantidades antes pesadas de componentes del medio de NYDB añadir las cantidades en ml de las dos soluciones de ácido cítrico 0,1 M y de fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M según el pH a preparar, y que está determinado en la Tabla 17.

Tabla 17: ml de las soluciones de ácido cítrico y de fosfato hidrógeno de sodio necesarias para modificar el pH de los medios NYDB.

pH	ml $C_6H_8O_7$ 0,1M	ml $Na_2HPO_4$ 0,2M
3	84,2	15,85
4	64,5	35,5
5	50,7	49,3
6	39,55	60,45
7	22,75	77,25
8	4,25	95,75

Comprobar que el pH obtenido sea el requerido según la adición de las proporciones de las dos soluciones y aforar a 100 ml con agua destilada.

Los medio pH 3, 4, 5, 6 esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min, y los de pH 7, 8, autoclavar a 110 °C por 15 min, a fin de evitar su caramelización.

### 7.3.1. NYDB pH modificado a 9 con solución glicina/cloruro de sodio/hidróxido de sodio.

#### COMPOSICIÓN

##### *MEDIO pH MOD 5: MEDIO NYDB CON pH MODIFICADO CON GLICINA/CLORURO DE SODIO/HIDRÓXIDO DE SODIO*

• Caldo nutritivo	0,8 g
• Extracto de levadura	0,5 g
• Glucosa	1,0 g
Agua destilada	hasta llegar a un volumen de 1000 ml
SOLUCIÓN TAMPONANTE pH 9: disuelto en	90 ml de agua destilada

- Glicina 0,751 g
- NaCl 0,585 g
- NaOH 1M 4 ml

## PREPARACIÓN

Para la preparación del medio de NYDB pH 9, no se puede utilizar la combinación de las dos soluciones antes mencionadas, por lo que se prepara esta solución siguiendo la técnica del libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986) de la siguiente forma:

Primero pesar todos los componentes del medio NYDB para 100 ml, luego adicionar 90 ml de la solución tamponante pH 9 poco a poco y en constante agitación hasta llegar a pH 9, aforar a 100 ml con agua destilada, homogeneizar y comprobar que el pH se encuentre a 9.

Autoclavar a 110 °C durante 15 min, a fin de evitar su caramelización.

## 7.4. Medio melaza de caña de azúcar y urea pH modificado con soluciones tamponantes.

### 7.4.1. Medio melaza de caña de azúcar con urea pH modificado con ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio.

Se prepara el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l urea 1,2 g/l a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con soluciones tamponantes de ácido cítrico 0,1 M y fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M.

## COMPOSICIÓN

**MEDIO pH MOD 6: MEDIO MELAZA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO CON ÁCIDO CÍTRICO/FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO.**

### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Ácido cítrico 0,1 M
- Fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M

### MEDIO MELAZA+UREA

- Melaza de caña de azúcar 4 g
- Urea 0,12 g
- Agua destilada hasta 100 ml.

## PREPARACIÓN

Pesar 4 g de melaza de caña de azúcar, 0,12 g de urea, adicionar los componentes de la solución tampón en diferentes proporciones según el pH que se desee preparar, siguiendo las indicaciones de la tabla del libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), pero tomando en cuenta que los volúmenes se modifican por la presencia de la melaza y la urea que tienen un pH entre 4,5 y 5,5 por lo que se utilizan diferentes proporciones de las soluciones antes mencionadas.

Los volúmenes utilizados se detallan en la Tabla 18.

Tabla 18: ml de las soluciones de ácido cítrico y de fosfato hidrógeno de sodio necesarias para modificar el pH de los medios melaza y urea.

pH	ml C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,1 M	ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M
3	87,2	13,8
4	64,5	35,5
5	49,5	50,5
6	37,0	63,0
7	22,7	81,3
8	0	100,0

Los pH obtenidos no son exactos, pero son los más aproximados a los deseados.

Matraces Erlenmeyer con las soluciones de melazas pH 3, 4, 5, 6 son esterilizados a 121 °C durante 15 min, y pH 7, 8, se autoclavan a 110 °C por 15 min.

### 7.4.2. Medio melaza caña de azúcar y urea pH modificado a 9 con solución glicina/cloruro de sodio/hidróxido de sodio.

#### COMPOSICIÓN

**MEDIO pH MOD 7: MEDIO MELAZA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO CON GLICINA, CLORURO DE SODIO Y HIDRÓXIDO DE SODIO**

SOLUCIÓN pH 9: preparada siguiendo la metodología del apartado 7.3.1.

- Melaza caña de azúcar 4 g
- Urea 0,12 g
- Agua destilada hasta 100 ml

## PREPARACIÓN

Para el medio melaza de caña de azúcar pH 9, no se puede utilizar la combinación de las dos soluciones antes mencionadas, por lo que se prepara siguiendo la técnica del libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986) de la siguiente forma:

Pesar 4 g de melaza de caña de azúcar, 0,12 g de urea, añadir 90 ml de la solución tamponante pH 9 poco a poco y en constante agitación hasta llegar a pH 9, aforar a 100 ml con agua destilada, agitar hasta la completa homogeneización y comprobar que el pH se encuentre en 9.

Esterilizar en autoclave a 110 °C durante 15 min, para evitar que se caramelize el medio.

### 7.4.3. Medio melaza caña de azúcar y urea pH modificado a 7 con ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio.

En este medio de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se reemplazan las soluciones tampón de ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio por soluciones tampón ftalato hidrógeno de potasio /hidróxido de sodio para modificar el pH del medio.

## COMPOSICIÓN

### **MEDIO pH MOD 8: MEDIO MELAZA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO A 7 CON FTALATO HIDRÓGENO DE POTASIO/HIDRÓXIDO DE SODIO**

Para 100 ml de medio.

#### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Ftalato hidrógeno de potasio 0,2 M 47,6 ml
- Hidróxido de sodio 0,2 M 2,1 ml

#### MEDIO MELAZA+UREA

- Melaza caña de azúcar 2 g
- Urea 0,06 g
- Agua destilada hasta 50 ml

## PREPARACIÓN

Teniendo como referencia la proporción de las dos soluciones utilizadas para llegar a un pH 7, detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986) y considerando que el pH del medio melaza y urea está alrededor de 4,5 y 5,5.



Preparar 50 ml de medio melaza y urea, siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2, e incorporar los volúmenes de los componentes de la solución tampón, leer el pH, ajustar a 7 con pocas gotas de cada solución respectivamente, llevar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.

#### **7.4.4. Medio melaza caña de azúcar y urea pH modificado a 7 con con tartrato hidrógeno de potasio.**

Se modifica el pH del medio de melaza de caña de azúcar y urea con otra solución tamponante que es el tartrato hidrógeno de potasio.

#### ***MEDIO pH MOD 9: MEDIO MELAZA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO A 7 CON TARTRATO HIDRÓGENO DE POTASIO***

Para 100 ml de medio.

##### **SOLUCIÓN TAMPONANTE:**

- Tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M 14,3 ml

##### **MEDIO MELAZA+UREA**

- Melaza caña de azúcar 2 g
- Urea 0,06 g
- Agua destilada hasta 50 ml

#### **PREPARACIÓN**

Teniendo como referencia el volumen de la solución tampón tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M utilizado para llegar a un pH 7, detallado en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986).

Preparar 50 ml de medio melaza de caña de azúcar y urea, siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2, e incorporar el volumen de la solución tampón, leer el pH, ajustar según el obtenido a 7 con gotas de la solución tampón, llevar a 100 ml y esterilizar por filtración.

Se utiliza aproximadamente 14,3 ml.

#### **7.4.5. Medio melaza caña de azúcar y urea pH modificado a 7 con fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio.**

##### **COMPOSICIÓN**

***MEDIO pH MOD 10: MEDIO MELAZA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO A 7 CON FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO /FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO.***

##### **SOLUCIÓN TAMPONANTE:**

- |   |         |
|---|---------|
| • Solución de fosfato hidrógeno de sodio 0,03 M     | 19,3 ml |
| • Solución de fosfato dihidrógeno de potasio 0,01 M | 20,0 ml |

##### **MEDIO MELAZA+UREA**

- |                         |             |
|-------------------------|-------------|
| • Melaza caña de azúcar | 2 g         |
| • Urea                  | 0,06 g      |
| • Agua destilada        | hasta 50 ml |

##### **PREPARACIÓN**

Preparar 50 ml de medio melaza caña de azúcar y urea, siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2, e incorporar los volúmenes de los componentes de la solución tampón, los cuales se calcularon tomando como referencia las proporciones utilizadas para llegar a un pH 7, detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986).y el pH del medio melaza de caña de azúcar y urea, leer el pH, ajustar a 7 con gotas de una de las dos soluciones componentes de la solución tampón, llevar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.

#### **7.5. Medio melaza de remolacha azucarera modificado su pH con diferentes ácidos bases y soluciones tamponates.**

##### **7.5.1. Medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l pH modificado con ácido clorhídrico.**

Al medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l, se modifican sus pH a valores de 4 y 5 con ácido clorhídrico.

## COMPOSICIÓN

**MEDIO pH MOD 11: MEDIO MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO.**

- Ácido clorhídrico 1 N

### MEDIO MELAZA+UREA

- Melaza de remolacha azucarera 4 g
- Urea 0,12 g
- Agua destilada hasta 100 ml

## PREPARACIÓN

Para 100 ml de medio, pesar 4 g de melaza de remolacha azucarera, 0,12 g de urea, adicionar un poco de agua, disolver bien, medir el pH. Según el valor obtenido ir adicionando gota a gota HCl 1 N, homogeneizar bien y leer el pH, hasta obtener el valor requerido, completar a 100 ml la solución con agua destilada, medir nuevamente el pH y confirmar que no haya variado.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

En la Tabla 19 se detallan los volúmenes utilizados de ácido clorhídrico utilizados para modificar el pH.

**Tabla 19: ml de solución de ácido clorhídrico 1 N, necesarios para modificar el pH del medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l urea 1,2 g/l.**

pH DEL MEDIO	HCl 1N (ml)
4	2,2
5	0,3

### 7.5.2. Medio melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l pH modificado con solución tampón ácido cítrico y fosfato hidrógeno de sodio.

#### COMPOSICIÓN

**MEDIO pH MOD 12: MEDIO MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO CON ÁCIDO CÍTRICO/FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO.**

#### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Ácido cítrico 0,1 M
- Fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M

#### MEDIO MELAZA+UREA

- Melaza de remolacha azucarera 4 g
- Urea 0,12 g
- Agua destilada hasta 100 ml

#### PREPARACIÓN

Para 100 ml de solución: pesar 4 g de melaza de remolacha azucarera y 0,12 g de urea y adicionar diferentes proporciones de las dos soluciones de ácido cítrico 0,1 M y fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M según el pH que se desee, tomando como referencia los valores detallados en la tabla del libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), pero que se modifican por la presencia de la melaza de remolacha azucarera y la urea, solución que tiene un pH alrededor de 6 o 7. Se utilizan diferentes proporciones de las soluciones antes mencionadas, homogeneizar y leer el pH, completar a 100 ml la solución con agua destilada y confirmar el pH.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Los volúmenes utilizados se detallan en la Tabla 20.

**Tabla 20: ml de solución de ácido cítrico 0,1 M fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M, necesarios para modificar el pH del medio melaza de remolacha azucarera 40g /l y urea 1,2 g/l.**

pH DEL MEDIO	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 M (ml)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> 0,1 M (ml)
4	66,2	33,8
5	51,6	48,4

### 7.5.3. Medio melaza de remolacha azucarera y urea pH modificado a 7 con ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio.

En este medio de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se reemplazan las soluciones tampón de ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio utilizados en anteriores experiencias por otra solución tampón que es el complejo ftalato hidrógeno de potasio /hidróxido de sodio para modificar el pH del medio.

#### COMPOSICIÓN

**MEDIO pH MOD 13: MEDIO MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO A 7 CON FTALATO HIDRÓGENO DE POTASIO/HIDRÓXIDO DE SODIO**

Para 100 ml de medio.

#### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Ftalato hidrógeno de potasio 0,2 M 48,2 ml
- Hidróxido de sodio 0,2 M 0,7 ml

#### MEDIO MELAZA+UREA

- Melaza de remolacha azucarera 2 g
- Urea 0,06 g
- Agua destilada hasta 50 ml

#### PREPARACIÓN

En base a los datos referenciales de la proporción de las dos soluciones utilizadas para llegar a un pH 7 detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986) y el pH del medio melaza remolacha azucarera y urea, preparar 50 ml de medio, siguiendo la metodología del medio ENR 52 del apartado 6.12.2, e incorporar los volúmenes de los componentes de la solución tampón, leer el pH, ajustar a 7 con pocas gotas de cada solución respectivamente, llevar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.

### 7.5.4. Medio melaza remolacha azucarera y urea pH modificado a 7 con tartrato hidrógeno de potasio.

Al igual que el medio anterior, se modifica el pH del medio melaza de remolacha azucarera y urea con otra solución tamponante que es el tartrato hidrógeno de potasio.

**MEDIO pH MOD 14: MEDIO MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO A 7 CON TARTRATO HIDRÓGENO DE POTASIO**

**SOLUCIÓN TAMPONANTE:**

- Tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M 12,8 ml

**MEDIO MELAZA+UREA**

- Melaza de remolacha azucarera 2 g
- Urea 0,06 g
- Agua destilada hasta 50 ml

**PREPARACIÓN**

Preparar 50 ml de medio melaza de remolacha azucarera y urea, siguiendo la metodología del medio ENR 52 del apartado 6.12.2, incorporar el volumen de la solución tampón, teniendo como dato referencial los valores detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), leer el pH, ajustar según el obtenido a 7 con gotas de la solución tampón. Llevar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración. Se utiliza aproximadamente 12,8 ml.

**7.5.5. Medio melaza de remolacha azucarera y urea pH modificado a 7 con fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio.**

**COMPOSICIÓN**

**MEDIO pH MOD 15: MEDIO MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l pH MODIFICADO A 7 CON FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO /FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO.**

**SOLUCIÓN TAMPONANTE:**

- Solución de fosfato hidrógeno de sodio 0,03 M 20,5 ml
- Solución de fosfato dihidrógeno de potasio 0,01 M 20,0 ml

**MEDIO MELAZA+UREA**

- Melaza de remolacha azucarera 2 g
- Urea 0,06 g
- Agua destilada hasta 50 ml

## PREPARACIÓN

Preparar 50 ml de medio melaza de remolacha azucarera y urea, siguiendo la metodología del medio ENR 52 del apartado 6.12.2, e incorporar los volúmenes de los componentes de la solución tampón, los cuales se calcularon tomando como referencia las proporciones utilizadas para llegar a un pH 7, detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), leer el pH ajustar a 7 gota a gota con una de las dos soluciones componentes de la solución tampón, llevar a 100 ml con agua destilada y esterilizar por filtración.

### 7.6. Medios mínimos salinos modificados sus pH con diferentes complejos tamponantes.

#### 7.6.1. Medio mínimo salino modificado a pH 4 con ftalato hidrógeno de potasio/hidróxido de sodio.

En este medio de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se reemplazan las soluciones tampón de ácido cítrico/fosfato hidrógeno de sodio utilizados en anteriores experiencias por otra solución tampón que es el complejo ftalato hidrógeno de potasio /hidróxido de sodio para modificar el pH del medio.

## COMPOSICIÓN

### **MEDIO pH MOD 16: MEDIO MÍNIMO SALINO pH MODIFICADO A 4 CON FTALATO HIDRÓGENO DE POTASIO/HIDRÓXIDO DE SODIO**

Para 100 ml de medio

#### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- |                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| • Ftalato hidrógeno de potasio 0,2 M | 49,7 ml |
| • Hidróxido de sodio 0,2 M           | 0,3 ml  |
| • MEDIO MÍNIMO SALINO                | 50 ml   |

disuelto en 500 ml en lugar de 1000 ml

## PREPARACIÓN

El medio mínimo salino preparado siguiendo la metodología del apartado 3.1 en lugar de aforarse a un litro, se afora a 500 ml, es decir que está el doble de concentrado.

Teniendo como referencia la proporción de las dos soluciones utilizadas para llegar a un pH 4,

detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), y sabiendo que el pH del medio mínimo salino se encuentra aproximadamente entre 5,7 y 5,9, tomar 50 ml de medio mínimo salino preparado siguiendo la metodología del apartado 3.1, pero más concentrado, e incorporar los componentes de la solución tampón en varias combinaciones hasta llegar a pH 4, aforar a 100 ml con agua destilada, leer nuevamente el pH y esterilizar por filtración.

Los volúmenes de las dos soluciones componentes del complejo tamponante en que se obtiene pH 4 se detallan en la composición.

#### **7.6.2. Medio mínimo salino modificado a pH 4 con tartrato hidrógeno de potasio.**

Al igual que el medio anterior, se modifica el pH del medio mínimo salino con otra solución tamponante que es el tartrato hidrógeno de potasio.

#### ***MEDIO pH MOD 17: MEDIO MÍNIMO SALINO pH MODIFICADO A 4 CON TARTRATO HIDRÓGENO DE POTASIO***

Para 100 ml de medio

##### **SOLUCIÓN TAMPONANTE:**

Tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M 11 ml

• MEDIO MÍNIMO SALINO 50 ml

disuelto en 500 ml en lugar de 1000 ml

#### **PREPARACIÓN**

Tomar 50 ml del medio mínimo salino preparado según se explicó en el apartado 7.6.1 más concentrado y en base a la metodología del apartado 3.1, adicionar poco a poco con agitación y lectura del pH, la solución de tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M hasta llegar a un pH de 4, teniendo como referencia los valores de la solución utilizadas para llegar a un pH 4, detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), y sabiendo que el pH del medio mínimo salino se encuentra aproximadamente entre 5,7 y 5,9. Aforar a 100 ml con agua destilada y leer nuevamente el pH. Esterilizar por filtración.

Se utiliza aproximadamente 11 ml.



### 7.6.3. Medio mínimo salino modificado a pH 4 con acetato de sodio/ácido acético.

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 18: MEDIO MÍNIMO pH MODIFICADO A 4 CON ACETATO DE SODIO/ÁCIDO ACÉTICO*

##### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Solución de acetato de sodio 0,1 N 16,5 ml
- Solución de ácido acético 0,1 N 5 ml

MEDIO MÍNIMO SALINO : aforado a 500 ml en lugar de 1000 ml 50 ml

#### PREPARACIÓN

En 50 ml de medio mínimo salino, preparado siguiendo la metodología explicada en el apartado 7.6.1 más concentrado y en base a la metodología del apartado 3.1, adicionar gota a gota la mezcla de las soluciones de acetato de sodio y ácido acético, tomando como referencia la proporción de las dos soluciones utilizadas para llegar a un pH 4, detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), y sabiendo que el pH del medio mínimo salino se encuentra aproximadamente entre 5,7 y 5,9, aforar a 100 ml con agua destilada y leer nuevamente el pH, esterilizar por filtración.

Los volúmenes de las dos soluciones se detallan en composición y en total se utilizan aproximadamente 17 ml.

### 7.6.4. Medio mínimo salino modificado a pH 7 con fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio.

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 19: MEDIO MÍNIMO MODIFICADO SU pH A 7 CON FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO/FOSFATO DIHIDRÓGENO DE POTASIO.*

##### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Solución de fosfato hidrógeno de sodio 0,03 M 20,5 ml
- Solución de fosfato dihidrógeno de potasio 0,01 M 20 ml

MEDIO MÍNIMO SALINO 50 ml

aforado a 500 ml en lugar de 1000 ml

## PREPARACIÓN

En 50 ml de medio mínimo salino, preparado siguiendo la metodología explicada en el apartado 7.6.1 más concentrado y en base a la metodología del apartado 3.1, adicionar gota a gota la mezcla en partes iguales de las soluciones de fosfato hidrógeno de sodio/fosfato dihidrógeno de potasio, preparada tomando como referencia la proporción de las dos soluciones utilizadas para llegar a un pH 7 detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), y sabiendo que el pH del medio mínimo salino se encuentra aproximadamente entre 5,7 y 5,9, leer el pH y cuando está a 7 aforar a 100 ml con agua destilada y leer nuevamente el pH. Esterilizar el medio por filtración.

Los volúmenes de las dos soluciones se detallan en composición y se utilizan aproximadamente 41 ml de la mezcla de las dos soluciones.

### 7.6.5. Medio mínimo salino pH modificado a 7 con fosfato hidrógeno de sodio.

Se modifica el pH del medio mínimo con una solución de fosfato hidrógeno de sodio 0,1 M.

## COMPOSICIÓN

### *MEDIO pH MOD 20: MEDIO MÍNIMO pH 7 MODIFICADO CON FOSFATO HIDRÓGENO DE SODIO*

#### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Solución de fosfato hidrógeno de sodio 0,1 M 20,5 ml

MEDIO MÍNIMO SALINO 50 ml

disuelto en 500 ml en lugar de 1000 ml

## PREPARACIÓN

En 50 ml de medio mínimo salino, preparado siguiendo la metodología explicada en el apartado apartado 7.6.1 más concentrado y en base a la metodología del apartado 3.1, adicionar gota a gota la solución de fosfato hidrógeno de sodio tomando como referencia el volumen utilizado para llegar a un pH 7, detallado en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), y que el pH del medio mínimo salino se encuentra aproximadamente entre 5,7 y 5,9, leer el pH y cuando está a 7 aforar a 100 ml y leerlo nuevamente. Esterilizar el medio por filtración.

Se utilizan aproximadamente 20,5 ml de solución.

### 7.6.6. Medio mínimo salino pH modificado a 8 con acetato de sodio/hidróxido de sodio

Se utiliza este complejo de tampón para modificar el pH del medio mínimo salino a 8.

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 21: MEDIO MÍNIMO SALINO pH MODIFICADO A 8 CON COMPLEJO TAMPÓN DE ACETATO DE SODIO/HIDRÓXIDO DE SODIO*

##### SOLUCIÓN TAMPONANTE:

- Solución de acetato de sodio 0,2 N 13 ml
- Solución de hidróxido de sodio 0,6 N 3 ml

MEDIO MÍNIMO SALINO: aforado a 500 ml en lugar de 1000 ml 50 ml

#### PREPARACIÓN

Adicionar a 50 ml de medio mínimo salino, preparado siguiendo la metodología explicada en el apartado 7.6.1 más concentrado y en base a la metodología del apartado 3.1, la mezcla de la solución de acetato de sodio y de hidróxido de sodio, tomando como referencia la proporción de las dos soluciones utilizadas para llegar a un pH 8, detallados en el libro *Biochemical Research* (Dawson *et al.*, 1986), y sabiendo que el pH del medio mínimo salino se encuentra aproximadamente entre 5,7 y 5,9. Leer el pH y cuando se encuentre a 8 aforar a 100 ml con agua destilada y leer nuevamente el pH. Esterilizar el medio por filtración.

Se utiliza aproximadamente 13 ml de acetato de sodio 0,2 N y 3 ml de hidróxido de sodio 0,6 N, es decir 16 ml de la mezcla de las dos soluciones.

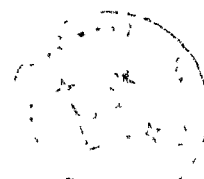
### 7.7. Medio mínimo salino en que se reemplaza la glucosa por diferentes fuentes de carbono.

#### 7.7.1. Medio mínimo salino sin fuentes de carbono.

#### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO pH MOD 22: MEDIO MÍNIMO SALINO SIN GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO*

- Medio mínimo salino sin glucosa 100 ml



**PREPARACIÓN**

Se prepara el medio mínimo salino siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.1, con la excepción que no se incorpora la solución de glucosa.

**7.7.2. Medio mínimo salino con ácido cítrico modificado a pH 3.****COMPOSICIÓN*****MEDIO pH MOD 23: MEDIO MÍNIMO SALINO EN QUE SE REEMPLAZA LA GLUCOSA POR ÁCIDO CÍTRICO***

- |                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| • Medio mínimo salino sin glucosa | 100 ml |
| • Ácido cítrico                   | 2,5 g  |

**PREPARACIÓN**

Disolver el ácido cítrico en un volumen de 20 ml del medio mínimo salino, esterilizar por filtración por membrana, e incorporar al resto de la solución preparado siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.1, pero que no tiene glucosa como fuente de carbono y que también está estéril, leer el pH.

**7.7.3. Medio mínimo salino con tartrato hidrógeno de potasio modificado a pH 4.****COMPOSICIÓN*****MEDIO pH MOD 24: MEDIO MÍNIMO SALINO EN QUE SE REEMPLAZA LA GLUCOSA POR TARTRATO HIDRÓGENO DE POTASIO***

- |                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| • Medio mínimo salino sin glucosa     | 100 ml |
| • Tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M | 13 ml  |

**PREPARACIÓN**

Tomar 50 ml de medio mínimo salino sin glucosa más concentrado preparado siguiendo la metodología del apartado 3.1, pero en lugar de aforar a 1000 ml, se afora a 500 ml, es decir que es un medio el doble de concentrado, adicionar gota a gota y con constante agitación el tartrato hidrógeno de potasio 0,3 M, hasta obtener pH 4, aforar la solución obtenida a 100 ml con agua destilada, confirmar que el pH de la solución se encuentre a 4 y esterilizar por filtración por membrana.

#### 7.7.4. Medio mínimo salino con ftalato hidrógeno de potasio modificado a pH 4.

##### COMPOSICIÓN

**MEDIO pH MOD 25: MEDIO MÍNIMO SALINO EN QUE SE REEMPLAZA LA GLUCOSA POR FTALATO HIDRÓGENO DE POTASIO**

- |                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| • Medio mínimo salino sin glucosa    | 100 ml |
| • Ftalato hidrógeno de potasio 0,1 M | 22 ml  |

##### PREPARACIÓN

En 50 ml de medio mínimo salino más concentrado preparado siguiendo la metodología del apartado 3.1, y explicado en el apartado anterior, adicionar gota a gota y con constante agitación la solución de ftalato hidrógeno de potasio 0,1 M, hasta obtener pH 4, aforar la solución obtenida a 100 ml con agua destilada, confirmar que el pH se encuentre en 4 y esterilizar por filtración por membrana.

### 8. Medios de cultivo de melaza de caña de azúcar con urea a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ).

#### 8.1. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,999.

##### COMPOSICIÓN

**MEDIO  $a_w$  1: MELAZA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l ACTIVIDAD DE AGUA 0,999**

- |                         |               |
|-------------------------|---------------|
| • Melaza caña de azúcar | 40 g          |
| • Urea                  | 1,2 g         |
| • Agua destilada        | hasta 1000 ml |

##### PREPARACIÓN

Pesar 40 g de melaza de caña de azúcar y 1,2 g de urea, adicionar 960 ml de agua, disolver bien la melaza y homogeneizar el medio, completar el volumen de medio a 1000 ml, medir el pH.

Autoclavar a 121 °C durante 15 min, enfriar, tomar una alícuota de 50 ml y medir la actividad de agua ( $a_w$ ).

## 8.2. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,972.

### COMPOSICIÓN

*MEDIO  $a_w$  2: MELAZA 250 g/l UREA 1,2 g/l ACTIVIDAD DE AGUA 0,972*

- Melaza caña de azúcar 250 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### PREPARACIÓN

Pesar 250 g de melaza de caña de azúcar y 1,2 g de urea, adicionar 750 ml de agua, disolver la melaza y homogeneizar el medio, llevar el volumen del medio a 1000 ml, medir el pH.

Autoclavarlo a 110 °C durante 15 min para evitar su caramelización, enfriar, tomar una alícuota de 50 ml y medir la  $a_w$ .

## 8.3. Medio melaza caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,968.

### COMPOSICIÓN

*MEDIO  $a_w$  3: MELAZA 350 g/l UREA 1,2 g/l ACTIVIDAD DE AGUA 0,968*

- Melaza caña de azúcar 350 g
- Urea 1,2 g
- Agua destilada hasta 1000 ml

### PREPARACIÓN

Pesar 350 g de melaza de caña de azúcar y 1,2 g de urea, adicionar un volumen de 650 ml de agua destilada, mezclar hasta completa disolución de la melaza, llevar el medio a un volumen de 1000 ml, medir el pH.

Autoclavarlo a 110 °C durante 15 min, para evitar que se caramelice, enfriar, tomar una alícuota de 50 ml y medir la  $a_w$ .

#### 8.4. Medio melaza de caña de azúcar con urea. $a_w$ 0,966.

##### COMPOSICIÓN

*MEDIO  $a_w$  4: MELAZA 500 g/l UREA 1,2 g/l ACTIVIDAD DE AGUA 0,966*

- |                         |               |
|-------------------------|---------------|
| • Melaza caña de azúcar | 500 g         |
| • Urea                  | 1,2 g         |
| • Agua destilada        | hasta 1000 ml |

##### PREPARACIÓN

Pesar 500 g de melaza de caña de azúcar y 1,2 g de urea, adicionar 500 ml de agua destilada, mezclar hasta total disolución de la melaza, completar el volumen del medio a 1000 ml, medir el pH.

Autoclavarlo a 110 °C durante 15 min, enfriar, tomar una alícuota de 50 ml y medir la actividad de agua.

#### 8.5. Medio NYDB con glicerol. $a_w$ 0,964.

##### COMPOSICIÓN

*MEDIO  $a_w$  5: NYDB CON GLICEROL ACTIVIDAD DE AGUA 0,964*

MEDIO NYDB 25 %

- |                        |               |
|------------------------|---------------|
| • Caldo nutritivo      | 2 g           |
| • Extracto de levadura | 1,26 g        |
| • Glucosa              | 2,5 g         |
| • Glicerol             | 184 g         |
| • Agua destilada       | hasta 1000 ml |

##### PREPARACIÓN

Pesar cada uno de los componentes del medio NYDB, añadir 200 ml de agua destilada, mezclar hasta total disolución y completar el volumen del medio a 1000 ml, medir el pH.

Autoclavarlo a 110 °C durante 15 min, para evitar su caramelización, enfriar, tomar una alícuota de 50 ml y medir la actividad de agua.

## 8.6. Medio NYDB con glucosa. $a_w$ 0,96.

### COMPOSICIÓN

#### *MEDIO $a_w$ 6: NYDB CON GLUCOSA ACTIVIDAD DE AGUA 0,96*

##### MEDIO NYDB 50 %

- |                        |               |
|------------------------|---------------|
| • Caldo nutritivo      | 4 g           |
| • Extracto de levadura | 2,5 g         |
| • Glucosa              | 403,2 g       |
| • Agua destilada       | hasta 1000 ml |

### PREPARACIÓN

Pesar cada uno de los componentes del medio NYDB, añadir 200 ml de agua destilada, mezclar hasta total disolución y completar el volumen del medio a 1000 ml, medir el pH.

Autoclavarlo a 110 °C durante 15 min, para evitar la caramelización del medio, enfriar, tomar una alícuota de 50 ml y medir la actividad de agua.

## 8.7. Medios líquidos externos para mantener los medios de melazas urea a diferentes $a_w$ durante el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Para que se mantenga sin variación la  $a_w$  del medio melaza con urea durante el crecimiento de la cepa, es necesario que su crecimiento se realice rodeado de un medio externo que se encuentre a las mismas condiciones de  $a_w$ , para lo cual se prepara medio externo líquido con glicerol para las diferentes  $a_w$ .

En un recipiente de vidrio colocar un volumen que pueda cubrir externamente, al medio melaza+urea a diferentes  $a_w$  que se encuentra dentro de un matraz Erlenmeyer.

### 8.7.1. Medio glicerol. $a_w$ 0,998.

#### COMPOSICIÓN

- |                  |              |
|------------------|--------------|
| • Glicerol       | 2,76 g       |
| • Agua destilada | hasta 300 ml |



## PREPARACIÓN

Pesar el glicerol, añadir los 297 ml de agua destilada y agitar hasta completa disolución, completar el volumen a 300 ml. Distribuir 150 ml de esta solución en cada recipiente de vidrio, tapar y autoclavar a 110 °C, por 15 min, enfriar y colocar dentro en condiciones asépticas el matraz Erlenmeyer que contienen el medio de melaza y urea  $a_w$  0,999.

### 8.7.2. Medio glicerol. $a_w$ 0,971.

#### COMPOSICIÓN

- Glicerol 44,16 g
- Agua destilada hasta 300 ml

#### PREPARACIÓN

Pesar 44,16 g de glicerol, añadir los 255 ml de agua destilada y agitar hasta completa disolución, constatar que el volumen se encuentre en 300 ml o completarlo, distribuir 150 ml de medio en cada recipiente de vidrio, tapar y autoclavar a 110 °C, por 15 min, enfriar y colocar dentro en condiciones asépticas el matraz Erlenmeyer que contiene el medio de melaza con urea  $a_w$  0,972.

### 8.7.3. Medio glicerol. $a_w$ 0,967.

#### COMPOSICIÓN

- Glicerol 49,54 g
- Agua destilada hasta 300 ml

#### PREPARACIÓN

Pesar 49,54 g de glicerol, añadir 250 ml de agua destilada y agitar hasta su perfecta disolución. Completar el volumen a 300 ml con agua destilada, distribuir 150 ml de medio en cada recipiente de vidrio, tapar y autoclavar a 110 °C, por 15 min. Enfriar y colocar dentro de ellos en condiciones asépticas los matraces Erlenmeyer que contienen el medio de melaza y urea con  $a_w$  0,968.

## **9. Medio de melaza urea para crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en fermentador.**

### **9.1. Medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l para fermentador.**

El fermentador utilizado para esta experiencia tiene una capacidad de 5 l, y se prepara 3 litros de medio.

#### **COMPOSICIÓN**

##### ***MEDIO FER 1: MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR 40 g/l Y UREA 1,2 g/l***

- Melaza de caña de azúcar 120 g
- Urea 3,6 g
- Agua destilada hasta 3 l

#### **PREPARACIÓN**

Pesar 120 g de melaza de caña de azúcar y 3,6 g de urea, adicionar cantidad suficiente de agua destilada hasta la perfecta disolución de la melaza. Adicionar el resto de agua necesaria para llegar al volumen de 3 l, homogeneizar y medir el pH.

Colocar el medio preparado dentro del fermentador, taparlo, cubrir bien todas las zonas de salida al exterior del equipo y autoclavarlo a 121 °C durante 15 min.

Sacar luego con cuidado el equipo, colocarlo dentro de una cabina y dejar que se enfríe el medio en el flujo laminar de la cabina antes de utilizarlo para la respectiva fermentación.

### **9.2. Medio de melaza de remolacha azucarera 40 g/l y urea 1,2 g/l para fermentador.**

#### **COMPOSICIÓN**

##### ***MEDIO FER 2: MELAZA DE REMOLACHA AZUCARERA 40 g/l Y UREA 1,2 g/l***

- Melaza de remolacha azucarera 120 g
- Urea 3,6 g
- Agua destilada hasta 3 litros

## PREPARACIÓN

Pesar los dos componentes del medio y adicionar cantidad suficiente de agua destilada hasta la perfecta disolución de la melaza de remolacha azucarera. Luego adicionar el resto de agua hasta llegar al volumen de 3 l y homogeneizar. Medir el pH y autoclavarlo en el fermentador siguiendo la misma metodología explicada en el apartado 9.1.

## 10. Disoluciones amortiguadoras, reactivos y colorantes.

### 10.1. Solución tampón fosfato.

A fin de evitar problemas de ósmosis al mantener a los microorganismos antagonistas un cierto tiempo en suspensión acuosa, se utiliza una disolución tamponada de fosfato, formada por la mezcla de fosfato dihidrógeno de potasio y fosfato hidrógeno de potasio en determinada proporción para que la solución final tenga una molaridad de 0,05 y un pH de 6,5.

#### COMPOSICIÓN

- Disolución A: 27,2 g/l fosfato dihidrógeno de potasio (0,2 M)
- Disolución B: 34,8 g/l fosfato hidrógeno de potasio (0,2 M)

#### PREPARACIÓN

Para un volumen de 400 ml de solución, mezclar 70 ml de la disolución A, mas 30 ml de la disolución B, mas 300 ml de agua destilada, agitar bien y esterilizar en autoclave por 20 min a 121 °C.

### 10.2. Solución de Tween 80.

Con el objetivo de mantener en suspensión las esporas del *P. expansum* se utiliza la solución de Tween 80.

#### COMPOSICIÓN

- Tween 80 1 ml
- Agua destilada 1000 ml

#### PREPARACIÓN

Mezclar y disolver bien el Tween en el agua destilada, colocar en los tubos de ensayo 9 ml de la solución y autoclavar a 121 °C durante 15 min.

### 10.3. Solución colorante de azul de metileno.

Solución de colorante empleada para el recuento de levaduras viables por tinción con azul de metileno.

#### COMPOSICIÓN

- Azul de metileno 0,1 ml
- Agua destilada 1000 ml

#### PREPARACIÓN

Mezclar y homogeneizar bien el azul de metileno en agua destilada.

## 11. Conservación de los cultivos.

### 11.1. Conservación en criobolas a -20 °C de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Para la conservación de la cepa *C. sake* (CPA-1) durante mucho tiempo y que presente unas buenas características como agente de biocontrol, se utiliza el sistema de conservación mediante criobolas del laboratorio AES.

Las criobolas están en un pequeño tubo. A estas criobolas se adhieren los microorganismos a conservar, sumergidos en una disolución hipertónica criopreservativa. Una vez inoculado el microorganismo en las bolas, los tubos se conservan entre -20 °C.

#### PREPARACIÓN

- Inocular estérilmente en el tubo de las criobolas un cultivo joven y puro del microorganismo a conservar.
- Agitar bien el tubo inoculado para asegurarse una distribución homogénea del microorganismo sobre las bolas.
- Luego se retira el máximo posible de la disolución criopreservativa, mediante una pipeta estéril.
- Los tubos con las criobolas se conservan en congelador a una temperatura de como mínimo de -20 °C.

#### UTILIZACIÓN DE LA CEPA CONSERVADA

- Sacar un tubo del congelador, no se aconseja sacar más de uno para evitar el calentamiento de los tubos no utilizados inmediatamente.

- Abrir el tubo en condiciones asépticas en el interior de una cabina de flujo laminar y extraer una criobola mediante una pinza estéril.
- Se deposita la criobola dentro de un tubo que contenga un medio líquido de cultivo apropiado para el microorganismo antagonista.
- Otra forma consiste en hacer girar la criobola sobre la superficie sólida de una placa Petri con un medio de cultivo adecuado para el microorganismo.
- El tubo o la placa Petri se incuban a una temperatura de 24 °C.
- El tubo con el resto de criobolas se vuelve a poner lo más rápido en el congelador.
- La criobola utilizada se esteriliza.

## **11.2. Mantenimiento.**

### **11.2.1. MANTENIMIENTO EN MEDIO NYDA A 4 °C DEL MICROORGANISMO ANTAGONISTA..**

La cepa *C. sake* (CPA-1) sembrada en medio según el apartado 11.1, es resembrada en dos tubos con medio NYDA, y colocada a 25 °C por el tiempo necesario para obtener el máximo crecimiento del antagonista antes de realizar cualquier ensayo, ya que es recomendable hacer experiencias con cultivos jóvenes.

De los dos tubos sembrados, uno se utiliza para realizar la experiencia y en el otro cuando el microorganismo está un poco crecido, se añaden 4 ml de una disolución amortiguadora para asegurar una alta actividad de agua en el medio, se sella bien y se mantiene en una cámara frigorífica a 4 °C, y servirá de reserva para realizar resiembras y para otros ensayos.

Se pueden realizar resiembras hasta 2 a 4 meses siguiendo igual proceso. Transcurrido este tiempo se debe determinar la capacidad antagonica del microorganismo como agente de biocontrol, y si es baja, eliminar la muestra y cambiar por otra, que se extraerá de la criobolas.

### **11.2.2. MANTENIMIENTO DEL MICROORGANISMO PATÓGENO.**

La cepa fúngica *P. expansum* aislada de fruta podrida procedente de centrales hortofrutícolas de la comarca del Segriá, se mantiene mediante periódicas resiembras en placas con medio PDA y antes de realizar una experiencia, se toma una pequeña porción del hongo con una asa estéril, se siembra en placas de PDA y se incuban en una estufa a  $28 \pm 1$  °C durante 7 días.

Con una periodicidad de 4 meses, es conveniente inocular la cepa de *P. expansum* en una

concentración de  $1.10^4$  ufc/ml en un agujero de manzana. Una vez se ha desarrollado la podredumbre, pasar con una asa estéril una porción del hongo a una placa de PDA y después de comprobar que no hay ninguna contaminación, pasarla a un tubo con PDA, el cual una vez que ha crecido el hongo se guarda perfectamente sellado en la nevera a una temperatura de 2 °C. Este tubo servirá para realizar posteriores resiembras. El objetivo de todo este proceso es mantener un alto grado de virulencia de la cepa.

## 12. Cálculo de las concentraciones.

### 12.1. Cálculo de la concentración de levaduras.

#### 12.1.1. RECUENTO EN CÁMARA THOMA.

Para calcular el número total de levaduras de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio líquido, se utiliza el método de la cámara cuentaglóbulos, mediante la cámara de Thoma con cubreobjetos. Este es un método utilizado especialmente cuando el crecimiento del antagonista se ha realizado en medios líquidos, por lo cual no se puede utilizar como blanco de calibración a la solución tampón.

### METODOLOGÍA

- Centrifugar la muestra crecida en los diferentes medios de cultivo en la centrífuga Beckman a 7000 rpm durante 10 min.
- Se descarta la solución líquida y el remanente, que es el microorganismo, se redisuelve en 50 ml de solución tampón. Después de homogeneizar y disolver bien, preparar 1 ó 2 diluciones, según sea necesario en función de la concentración y la mayor facilidad de realizar el recuento.
- Paralelamente se prepara la cámara Thoma, para lo cual primero se debe limpiar y secar bien la zona donde va el inóculo y el cubreobjetos. A continuación, se coloca el inóculo en la parte central de la cámara y mediante las pinzas laterales se sostiene y ajusta hasta que aparezcan los anillos de Newton.
- Descargar una gota de la suspensión homogeneizada en los dos extremos superior e inferior del cubreobjetos, de tal forma que el espacio existente entre el cubreobjetos y la parte central de la cámara quede cubierto de suspensión.
- Mediante un microscopio óptico se realiza el recuento del número de levaduras existentes en los cuadrantes de la diagonal principal de cada una de las dos cuadrículas.
- Cada cuadrícula tiene un área de  $1/400 \text{ mm}^2$  y una altura entre la superficie de la cámara y el

cubreobjetos de 0,1 mm, por tanto el volumen del líquido que queda sobre cada cuadrante es de  $1/4000 \text{ mm}^3$ .

- Por tanto, 1 ml contiene  $4 \cdot 10^6$  veces el número de levaduras contadas.
- Después de haber realizado el recuento de los cuatro cuadrantes de cada una de las dos cuadrículas se realiza el siguiente cálculo:

$$N(\text{ufc/ml}) = n / 80 \times 4 \cdot 10^6$$

N= número de células o microorganismos presentes en un mililitro de suspensión.

n= número total de microorganismos contados en las cuatro diagonales (80 cuadros).

### 12.1.2. TRANSMITANCIA.

En ensayos en los cuales se utiliza el medio NYDB como medio de crecimiento, se utiliza el porcentaje de transmitancia (%T) como medida para uniformizar la cantidad de microorganismo a ensayar, al igual que para preparar la solución madre para inocular en los diferentes medios de crecimiento.

La transmitancia es una medida inversamente proporcional a la concentración del microorganismo, es decir que a más concentración, mas bajo será el valor de la transmitancia, y se utiliza como blanco de calibración del espectrofotómetro la solución tampón, que corresponde a un 100 % de transmitancia.

Se ha escogido este parámetro como sistema de cálculo de la dosis del microorganismo antagonista o concentración para inocular en los diferentes medios de crecimiento a ensayar, ya que tiene una significativa uniformización de la masa microbiana aplicada en los medios de crecimiento al combinar número de microorganismos y tamaño del microorganismo al mismo tiempo, que presenta una mayor facilidad de cálculo (Janisiewicz, 1987).

La curva que relaciona el porcentaje de transmitancia (%T) con la concentración de los microorganismos antagonistas utilizados, medida en ufc/ml (Figura 1 del apartado de Materiales) ha sido desarrollada en el Laboratori de Patologia del Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA de Lleida, (Miró, 1997), y es la utilizada en la presente tesis para determinar la concentración del antagonista a inocular en función de la transmitancia.

## METODOLOGÍA

- Se parte de un cultivo del antagonista incubado en medio NYDA a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  durante el tiempo necesario para obtener un máximo crecimiento y con un asa esterilizada coger dos veces el

microorganismo y disolverlo bien en un tubo contenga 4,5 ml de solución tampón, o un volumen mayor según el número de medios de crecimiento.

- Esta suspensión concentrada es leída en el espectrofotómetro CECIL CE 1020 a una longitud de onda de 420 nm, en función de la transmitancia que tiene la muestra se diluye más la suspensión acuosa con tampón, hasta llegar a la transmitancia requerida.
- La suspensión obtenida es la suspensión madre para inocular en los diferentes medios de crecimiento.

## **12.2. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE *P. expansum* POR RECUENTO EN CÁMARA THOMA.**

El cálculo de la concentración del agente patógeno *P. expansum* para las diferentes experiencias se realiza por recuento en cámara Thoma.

### **METODOLOGÍA**

- Se prepara una suspensión de conidios en agua con Tween 80, introduciendo dos veces el asa previamente esterilizada y con una buena carga de esporas de un cultivo joven de *P. expansum* crecido de 7 - 12 días en medio PDA.
- Paralelamente se prepara la cámara Thoma y se realiza el recuento de número de conidios siguiendo la misma metodología y cálculo explicado en el apartado 12.1.1.
- Finalmente se realizan las diluciones correspondientes en la suspensión ya titulada de *P. expansum* hasta obtener la concentración deseada.

## **13. Determinación de levaduras viables por tinción con azul de metileno**

Para poder determinar de forma rápida el número de levaduras viables por mililitro de medio, que han crecido en un determinado medio de cultivo, se utiliza el método referenciado por Sanchis *et al.* (1994).

### **METODOLOGÍA**

- Primero se realiza un recuento del antagonista en cámara Thoma, explicado en el apartado 12.1.1.



- A continuación se coge 0,1 ml de la misma suspensión utilizada para el recuento en cámara y se coloca sobre un porta objetos. Adicionar de 2 a 3 gotas de azul de metileno a una concentración 0,01 % (p/v), homogeneizar con el colorante la muestra y poner un cubreobjetos. Dejar que se tiñan las células durante 4 o 5 min.
- Observar al microscopio con el objetivo x 40, contar el número de levaduras coloreadas de azul, y también contar las levaduras que quedan incoloras o transparentes.
- Las levaduras muertas son las que se tiñen de azul, mientras que las vivas permanecen incoloras.
- Según el número de levaduras que existen por campo, se cuentan varios, siguiendo la especificación de la Tabla 21.
- Una vez contadas las levaduras, calcular el porcentaje de vivas.

Tabla N 21: Número de campos a contar según la concentración de microorganismos por campo.

Número de células por campo	Número de campos a contar
0 - 3	64
4 - 6	32
7 - 12	16
13 - 25	8
26 - 50	4
51 - 100	2
>100	1

## 14. Optimización del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

### 14.1. Determinación del medio de cultivo más óptimo de la cepa *C. sake* (CPA-1), criterios para la selección de cada uno de los medios.

Para la producción de la cepa *C. sake* (CPA-1) a nivel industrial se debe buscar un medio de crecimiento económico con el que a la vez se obtenga una considerable masa de microorganismos. Por lo cual, se deben analizar diferentes puntos de vista como: parámetros de temperatura crecimiento, pH, tiempo y de tolerancia a condiciones adversas ambientales. Desde el punto de vista de requisitos de costos de producción, instalaciones y aprovisionamiento de materia prima o medio

de crecimiento y elaboración del mismo, ya que todos estos parámetros influyen en la factibilidad de su producción.

El primer objetivo de esta experiencia es buscar materias primas que pueden ser posibles medios de crecimiento, para lo cual deberán tener suficientes fuentes de nitrógeno, carbono, sales minerales y microelementos. Seleccionar los mejores medios a diferentes concentraciones mediante pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).

Además se realizarán pruebas de crecimiento en medios de cultivo que sean la combinación de dos simples, para analizar si se obtiene una mejor producción de masa microbiana.

El segundo objetivo de esta experiencia es hacer pruebas de crecimiento con los medios seleccionados en base a los requisitos antes establecidos, enriquecidos con diferentes nutrientes de los que son deficitarios para mejorar sus condiciones para el crecimiento del antagonista.

Luego de realizar una revisión bibliográfica sobre los posibles medios a utilizar para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), se seleccionaron los medios, en base a los siguientes criterios:

- Los precios de los referidos medios son bajos y de fácil adquisición para utilizarlos a nivel industrial.
- Son de fácil preparación y esterilización.
- Presentan en su composición los nutrientes necesarios para el crecimiento del antagonista.

Los medios con los que se realizan las pruebas son:

- Levadura de cerveza.
- Bagazo de cebada.
- Concentrado de zumo de manzana.
- Germen de cebada.
- Melaza de caña de azúcar.
- Melaza de remolacha azucarera.
- Lactosuero.
- Derivado láctico.
- Combinación de dos medios simples.
- Medios simples enriquecidos.

## 14.2. Preparación de la cepa *C. sake* (CPA-1) para inocular en los diferentes medios de crecimiento

Para todas las experiencias que se realizan en diferentes medios de crecimiento se prepara el microorganismo antagonista siguiendo esta metodología.

### METODOLOGÍA

1. Se parte de cultivos jóvenes, para lo cual se siembra el antagonista en tubos con medio NYDA durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista antes de realizar la experiencia, y se los incuba a  $25 \pm 1$  °C, y con éstos se procede a preparar la solución madre.
2. Para la preparación de la solución madre del tubo de NYDA con el antagonista, tomar con el asa previamente esterilizada a la llama del mechero un inóculo cargado, disolver en 4,5 ml de solución tampón hasta llegar a obtener una solución muy concentrada, a partir de la cual se preparará la solución madre de transmitancia conocida, aproximadamente 49,5 % que corresponde a  $1.10^6$  ufc/ml en base a la curva que relaciona porcentaje de transmitancia con concentración (Figura 2 del apartado de Materiales) y siguiendo el mismo proceso explicado en el apartado 12.1.2 de preparación de antagonista por transmitancia.
3. La solución madre utilizada para inocular, a la vez es sembrada en placas de NYDA, para esto se extrae una alícuota de 0,5 ml de suspensión y se introduce en un tubo de ensayo con 4,5 ml de solución tampón que corresponde a la dilución D1 y que es el punto de partida para las restantes diluciones a realizar. Para cada matraz Erlenmeyer se efectúan dos bancos de diluciones.
4. Se preparan de igual forma partiendo de la D1 y así sucesivamente hasta la dilución adecuada en función de la concentración del antagonista y cada una de estas diluciones se siembran en dos placas Petri con NYDA previamente identificadas, para lo cual en cada placa se inoculan 0,1 ml de la dilución correspondiente y luego se reparte de modo uniforme por toda la placa con la ayuda de una asa de Drigalski, y se ponen las mismas en estufa a crecimiento a  $25 \pm 1$  °C
5. El tubo con la solución madre, tras una buena agitación y homogeneización, inocular 0,5 ml en cada matraz Erlenmeyer que contiene cada medio de crecimiento a experimentar. Colocar los matraces Erlenmeyer inoculados en el orbital incubador a  $25 \pm 1$  °C de temperatura, y someterlos a crecimiento por agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista.
6. Una vez cumplido el tiempo de crecimiento, se sacan los matraces Erlenmeyer, se ponen en una

nevera, y se procede a sembrar sacando uno a uno.

7. Se extrae de cada matraz Erlenmeyer una alícuota de 0,5 ml de esta suspensión y se introduce en un tubo de ensayo con 4,5 ml de solución tampón que corresponde a la dilución D1 y que es el punto de partida para las restantes diluciones a realizar. Para cada matraz Erlenmeyer se efectúan dos bancos de diluciones.
8. Se preparan de igual forma partiendo de la D1 y así sucesivamente hasta la dilución adecuada en función de la concentración del antagonista y cada una de estas diluciones se siembran en dos placas Petri con NYDA previamente identificadas, para lo cual en cada placa se inoculan 0,1 ml de la dilución correspondiente y luego se reparte de modo uniforme por toda la placa con la ayuda de una asa de Drigalski.
9. Todas las placas se incuban a  $25 \pm 1$  °C durante 48 h. A continuación, se procede al recuento del número de colonias que se desarrollan en cada placa y en cada dilución. Para los cálculos de recuento se eligen las diluciones que contienen entre 30 y 300 colonias.

### **14.3. Combinación de medios de crecimiento.**

Para mejorar el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) se realizan combinaciones o mezclas de dos medios simples, para lo cual, se preparan 100 ml de medio combinado, mezclando 50 ml de un medio con 50 ml de otro medio, siguiendo la metodología explicada en los diferentes subapartados del apartado 5, según el medio que se quiere preparar.

Una vez homogeneizado el medio, se esteriliza y se deja enfriar. Se inoculan 0,5 ml de la solución madre del microorganismo antagonista, y se incuban durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista. Realizar el recuento siguiendo la metodología del apartado 14.2.

### **14.4. Enriquecimiento de los diferentes medios de crecimiento.**

#### **14.4.1. Medio concentrado de zumo de manzana con fuente de nitrógeno y sales minerales.**

Una de las posibles causas de los bajos crecimientos del antagonista en el medio simple de concentrado de zumo de manzana puede ser la deficiencia en fuentes de nitrógeno y sales minerales (Lee y Mattick, 1989). Por lo que se incorpora al medio, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y fosfato dihidrógeno de potasio como fuente de sales minerales, siguiendo la metodología del apartado 6.1.

Esterilizar los medios en matraces Erlenmeyer e inocular 0,5 ml de solución madre del antagonista, se incuban en agitación durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción de la cepa *C. sake* (CPA-1) y sembrar siguiendo la metodología del apartado 14.2.

#### **14.4.2. Medio de lactosuero con fuentes de nitrógeno y sales minerales.**

Como el medio de lactosuero presenta deficiencia de fuentes de nitrógeno y sales según referencias bibliográficas (Veissent, 1983), se incorpora a éste sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y fosfato de potasio como fuente de sales minerales, según la metodología explicada en el apartado 6.2.

Esterilizar e inocular 0,5 ml de la solución madre del antagonista y después del tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista de crecimiento sembrar siguiendo la metodología explicada en el apartado 14.2.

#### **14.4.3. Medio de lactosuero con fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales.**

El lactosuero como medio de crecimiento para levaduras necesita una suplementación de fuentes de carbono (Madrid, 1981; Lee y Mattick, 1989). Se realiza una suplementación del medio de cultivo con glucosa para determinar si mejora el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), utilizando la metodología del apartado 6.3, se esteriliza el medio e inocular 0,5 ml de la solución madre, y se deja incuba durante el tiempo necesario hasta obtener la máxima producción. Se siembra siguiendo la metodología del apartado 14.2.

#### **14.4.4. Medio de derivado láctico con fuentes de carbono.**

Otra materia prima utilizada como posible medio de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) es el derivado láctico, asignado con este nombre al líquido producto de la concentración del lactosuero, por lo que tiene una composición rica en nutrientes, pero algo deficitaria en fuentes de carbono. Por ello, se enriquece con glucosa siguiendo metodología del apartado 6.4, y se realizan pruebas de crecimiento bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado 14.4.3

## **15. Mejora de los medios melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera por adición de nutrientes.**

Las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera, por poseer muchos nutrientes necesarios para el crecimiento del antagonista, se utilizan como otros medios alternativos. En su composición tienen azúcares, proteínas y aminoácidos como fuente de nitrógeno y minerales (Imrie, 1969).

Según referencia bibliográfica, las melazas no contienen la suficiente cantidad de nitrógeno asimilable y ciertos elementos en su composición para permitir el crecimiento adecuado de levaduras, por lo se que recomienda adicionar sales de amonio o urea (Large, 1986), magnesio y fósforo (Reed y Nagodawithana, 1991) para suplir estas deficiencias.

Tomando como referencia los resultados de Usall (1995) que obtiene un mejor crecimiento del antagonista con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, y con la combinación de biotina, tiamina y piridoxina como vitaminas, se utilizará en esta parte experimental todos los nutrientes combinados con la melazas, tanto de caña de azúcar como de remolacha azucarera a las concentraciones recomendadas.

El objetivo de esta experiencia es realizar pruebas con los dos tipos de melazas a diferentes concentraciones hasta encontrar la que da el mejor crecimiento del antagonista mediante la preparación de diferentes medios detallados en los apartados 4.7 y 4.8. Una vez se haya obtenido esta concentración, realizar nuevas pruebas de enriqueciendo en el medio de melazas con otros nutrientes como fuentes de nitrógeno, vitaminas, minerales mediante la preparación de medios con diferentes nutrientes y en diferentes concentraciones detalladas en los apartados que van del 6.5 hasta el 6.13, y de esta forma perfeccionar el medio de cultivo, hasta llegar al más adecuado para el crecimiento óptimo del microorganismo antagonista.

Se realizan también pruebas de crecimiento en medios enriquecidos combinados de las dos melazas detallados en el apartado 6.14, para analizar si la mezcla de las dos, complementa las deficiencias nutricionales que presenta cada una por separado.

Se realiza también una experiencia adicional, con un medio de melaza a una concentración muy alta de 30 y 40 °Brix, es un medio recomendado por Reed y Nagodawitana (1991).

## **METODOLOGÍA**

- De todos los medios de melazas, se preparan 100 ml, los cuales se dividen en 2 matraces Erlenmeyer; cada uno de 50 ml, que servirán para hacer los crecimientos por duplicado.
- A cada matraz Erlenmeyer inocular 0,5 ml del antagonista preparado siguiendo la metodología explicada en el apartado 12.1.2.
- Incubar los matraces Erlenmeyer con agitación en orbital incubador a 150 rpm, y a  $25 \pm 1$  °C. Transcurrido el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista, sacarlos, colocarlos en nevera y proceder a sembrar de uno en uno siguiendo la metodología explicada en el apartado 14.2.

## **16. Determinación de los parámetros óptimos para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio melaza de caña de azúcar y urea.**

### **16.1. Determinación del rango de pH en el cual crece la cepa *C. sake* (CPA-1).**

#### **16.1.1. Determinación del rango de pH en el cual crece la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio NYDB.**

Al presentar el medio NYDB todos los componentes necesarios para el crecimiento del antagonista, se modifica el pH del referido medio a ácido y básico con ácidos y bases y con una solución tamponante. Se realiza el crecimiento del antagonista con el objetivo de establecer hasta que margen de pH puede crecer y si la solución tamponante cumple con su función de regular el cambio de pH y favorecer el crecimiento.

#### **METODOLOGÍA**

- Pesar los componentes del medio NYDB y modificar el pH a ácido con soluciones de ácido clorhídrico 1 N y a pH básico con solución de hidróxido de sodio 1 N siguiendo la metodología explicada en los apartados 7.1.
- También se modifica el pH a ácido y básico adicionando al medio NYDB, la combinación tamponante de solución de ácido cítrico 0,1 M y fosfato hidrógeno de sodio 0,2 M, en diferentes proporciones según el pH deseado, siguiendo la metodología del apartado 7.3.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2. Realizar el crecimiento con agitación durante el tiempo necesario para obtener la máxima producción y sembrar siguiendo la metodología del apartado 14.2.

#### **16.1.2. Determinación del rango de pH en el cual crece la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio mínimo salino para levaduras modificado su pH con diferentes soluciones de sales y soluciones tamponantes.**

Una vez establecido el medio mínimo salino para levaduras, se realizan pruebas de crecimiento del antagonista modificando su pH a ácido y básico con soluciones de ácidos, bases y varias soluciones tamponantes con el objetivo de establecer como afecta los diferentes pH en el crecimiento del microorganismo así como la influencia de las diferentes soluciones tamponantes en la modificación

del pH al final del crecimiento y en la mejora o no del mismo, y determinar la mejor solución tamponante.

## **METODOLOGÍA**

- Preparar el medio mínimo salino siguiendo la metodología del apartado 3.1 y modificar a pH ácido con soluciones de ácido clorhídrico 1 N y a pH básico con soluciones de hidróxido de sodio 1 N siguiendo la metodología explicada en los apartados 7.2.1.
- También se modifica el pH a ácido y básico adicionando al medio mínimo salino la combinación de las diferentes soluciones tamponantes siguiendo la metodología de los apartados 7.2.2 y 7.6.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2 y realizar el crecimiento por agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario para obtener la máxima producción del antagonista. Sembrar siguiendo la metodología del apartado 14.2.

### **16.1.3. Determinación del rango de pH en el cual crece la cepa *C. sake* (CPA-1) en el mejor medio de crecimiento.**

Una vez establecidos los mejores medios para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1), se realizan pruebas de modificación del pH de los referidos medios a ácido y básico con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio y soluciones tamponantes con el objetivo de establecer hasta que margen de pH puede crecer el antagonista en este medio, y como regulan las soluciones tamponantes en pH el final.

## **METODOLOGÍA**

- Pesar los componentes del medio y modificar el pH con la combinación de las soluciones tamponantes, en diferentes proporciones según el pH deseado, siguiendo la metodología de los apartados 7.4 y 7.5.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2 y realizar el crecimiento por agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista y sembrar siguiendo la metodología del apartado 14.2.



## 16.2. Determinación del rango temperatura en el cual crece la cepa *C. sake* (CPA-1).

Establecido el rango de pH de crecimiento del antagonista, es necesario establecer la temperatura a la que se tiene el mayor crecimiento en el menor tiempo, para lo cual se realizan pruebas a diferentes temperaturas, menores a 37 °C que es letal para el antagonista (Usall, 1995; Hurley *et al.*, 1987) con el objetivo de establecer los parámetros de temperatura de crecimiento.

### METODOLOGÍA

- Preparar el mejor medio de crecimiento, obtenido en base a las experiencias anteriores.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2.
- Colocar por duplicado los matraces Erlenmeyer a temperaturas de 20, 25, 30 °C, y realizar el crecimiento por agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario para obtener la máxima producción del antagonista y sembrar siguiendo la metodología del apartado 14.2.
- Realizar una segunda prueba colocando por duplicado los matraces Erlenmeyer a temperaturas de 22, 24, 26 °C, y realizar el crecimiento por agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario para obtener la máxima producción del antagonista y sembrar siguiendo la metodología del apartado 14.2.

## 16.3. Crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ).

El objetivo de esta experiencia es el determinar la influencia de las elevadas concentraciones de melaza de caña de azúcar en el medio de crecimiento y en el desarrollo del antagonista, determinando hasta que  $a_w$  crece la cepa *C. sake* (CPA-1) ya que el aumento de las concentraciones de melaza en el medio determina una disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ).

### METODOLOGÍA

- Se preparan los medios de melaza, en los que se ha variado la concentración de la melaza de caña de azúcar según la metodología explicada en los el apartado 8, leer su actividad de agua.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2.
- Incubar por duplicado los matraces Erlenmeyer con agitación a 150 rpm durante el tiempo

necesario para obtener la máxima producción del antagonista. A continuación, se siembra siguiendo la metodología del apartado 14.2.

## **17. Efecto de los diferentes nutrientes sobre el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio mínimo salino.**

Este ensayo tiene como objetivo evaluar el efecto de algunas sustancias que actúan como fuentes de carbono en el crecimiento del antagonista en el medio mínimo salino, a fin de poder determinar cual favorece más su crecimiento y la concentración ideal en un medio que contiene los requerimientos mínimos para el crecimiento de levaduras. La metodología se basa en la descrita por Janisiewicz *et al.* (1992).

### **METODOLOGÍA**

- Una vez determinado y especificado el medio mínimo salino adecuado para levaduras, se prepara éste con todos los elementos minerales, microelementos, fuente nitrogenada sin glucosa siguiendo la metodología del apartado 3.1. Se reemplaza la glucosa por otras fuentes de carbono como ácido cítrico, tartrato hidrógeno de potasio, ftalato hidrógeno de potasio y un último medio sin glucosa, metodología detallada en los subapartados del apartado 7.7.
- Se prepara el antagonista partiendo de un cultivo joven crecido en 50 ml de medio NYDB a  $25 \pm 1$  °C y 150 rpm el tiempo necesario para obtener su máximo crecimiento exponencial.
- El medio con el antagonista se centrifuga a 7000 rpm durante 10 min en una centrífuga J 21 (Beckman, Avantil J 25).
- La fracción líquida se descarta y el sedimento se redisuelve en 50 ml de solución tampón fosfato y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. La fracción sedimentada se redisuelve en una fracción de medio mínimo salino, sin fuente de carbono, y ésta es la solución concentrada a partir de la cual se prepara la solución madre con un 49,5 % de transmitancia, siguiendo la metodología explicada en el apartado 12.1.2, utilizando como blanco el mismo medio mínimo salino.
- Realizar pruebas de crecimiento en diferentes medios, inoculando 0,5 ml de la solución madre preparada anteriormente.
- Poner los matraces Erlenmeyer por duplicado a crecimiento por agitación en orbital incubador a 150 rpm a  $25 \pm 1$  °C y el tiempo necesario para obtener un máximo crecimiento del antagonista. Sacar los matraces Erlenmeyer, ponerlos en nevera y de uno en uno sacar para sembrar

siguiendo la metodología explicada en el apartado 14.2.

## **18. Pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en diferentes muestras de caña de azúcar y urea.**

### **18.1. Análisis físico-químico y pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en diferentes muestras de melaza de caña de azúcar.**

El objetivo de esta parte experimental es determinar si las melazas provenientes de diferentes lotes y de diferentes fechas de producción tienen las mismas características físicas y que en ellas se obtienen buenos y parecidos crecimientos del antagonista, al ser preparadas en las mismas condiciones.

Para ello, se procede a realizar el análisis físico de varias melazas, y posteriores crecimientos para poder determinar si existe o no diferencias en el crecimiento en las diferentes muestras, por lo que se trata de realizar todo el proceso lo más homogéneo posible entre cada muestra.

Con las distintas muestras, se preparan diferentes medios de crecimiento a la mejor concentración y con la fuente de nitrógeno que dio mejor resultado, sembrando en cada una de ellas el antagonista.

El crecimiento se realiza en matraz Erlenmeyer sometido a agitación en orbital a las mismas condiciones antes utilizadas.

### **METODOLOGÍA**

- Primero se identifica a cada muestra de melaza de caña de azúcar por medio de la asignación de un número.
- A continuación, se hace el análisis físicoquímico de las diferentes muestras de melazas.
- Entre los análisis que se hacen están:

**Lectura de los grados Brix:** Los grados Brix representan los sólidos disueltos de un azúcar en la muestra que se analiza. En las melazas de caña de azúcar se mide cada una de las muestras en un refractómetro marca CRISON, calibrado previamente con agua destilada.

**Lectura del pH:** Cada una de las muestras de melazas de caña de azúcar, se mide el pH en un potenciómetro marca Cecil, previamente calibrado.

**Lectura de la actividad de agua:** De cada muestra de melaza de caña de azúcar se mide la actividad de agua en la Novacina marca Thermoconstanter TH 200 previamente calibrada con

varios estándares que tengan rangos de actividad de agua alto y bajo. Una vez calibrada se deja la muestra aproximadamente 2 h en la Novacina para obtener resultados comparables.

- A continuación se prepara el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l con las diferentes muestras de melaza de caña de azúcar, siguiendo la metodología del MEDIO ENR 22 explicada en el apartado 6.5.2. A cada uno de los medios de melazas de las diferentes muestras se hacen los siguientes análisis fisicoquímicos:
- **Medición del pH:** De igual forma que las melazas puras.
- **Medición de la actividad de agua:** De igual forma que las melazas puras, pero las muestras deben estar previamente autoclavadas para realizar la lectura de la  $a_w$ .
- Sembrar el antagonista partiendo de una solución madre con transmitancia de 49,5 % preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2. Tras una buena agitación y homogeneización, inocular 0,5 ml de ésta en cada matraz Erlenmeyer.
- Incubar los matraces Erlenmeyer en un agitador orbital a  $25 \pm 1$  °C y a 150 rpm. Tomar alícuotas para sembrar al tiempo que se considera que el antagonista presenta su mayor crecimiento, siguiendo la metodología del apartado 14.2.
- Incubar las placas sembradas durante 48 h a  $25 \pm 1$  °C, para con posterioridad realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro.

## **18.2. Pruebas de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha azucarera con urea o sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno con diferentes grados de pureza.**

El objetivo de esta parte experimental es analizar si en urea y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno, con diferentes grados de pureza se obtienen buenos crecimientos del antagonista.

Para ello, se preparan los diferentes medios de crecimiento a la mejor concentración y con las diferentes fuente de nitrógeno.

El crecimiento se realiza en matraces Erlenmeyer sometidos a agitación en orbital a las mismas condiciones antes utilizadas.

### **METODOLOGÍA**

- Se prepara el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l (20 mM) con las diferentes muestras de urea; pura con 99 % de pureza, cristalina con 98 % de pureza e industrial con 46 %

de pureza , siguiendo la metodología del MEDIO ENR 22 explicada en el apartado 6.5.2.

- Preparar también el medio de melaza de caña de azúcar 40 g/l y sulfato de amonio 2,65 g/l (20 mM) con las diferentes muestras de sulfato de amonio; puro con 99% de pureza, comercial con 98 % de pureza y 90 % de pureza, siguiendo la metodología del MEDIO ENR 33 explicada en el apartado 6.6.1.
- Preparar los mismos medios pero con melaza de remolacha azucarera siguiendo las metodologías del medio ENR 52 del apartado 6.12.2 y del medio ENR 76 del apartado 6.13.
- Sembrar el antagonista partiendo de una solución madre con transmitancia de 49,5 % preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2. Tras una buena agitación y homogeneización, inocular 0,5 ml de ésta en cada matraz Erlenmeyer.
- Incubar los matraces Erlenmeyer en un agitador orbital que está a  $25 \pm 1$  °C y a 150 rpm. Tomar alícuotas para sembrar al tiempo que se considera que el antagonista tiene su mayor crecimiento, siguiendo la metodología del apartado 14.2.
- Incubar las placas sembradas durante 48 h a  $25 \pm 1$  °C, para después realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro.

## **19. Influencia de la variación de la concentración del inoculo en la producción de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

Una vez establecido el mejor medio de crecimiento tanto en composición como en concentración, se realizan pruebas de crecimiento con diferentes concentraciones de inoculo a fin de determinar su influencia en la concentración final del antagonista.

### **METODOLOGÍA**

- Preparar soluciones madres a concentraciones  $1.10^2$ ,  $1.10^3$ ,  $1.10^4$ ,  $1.10^5$  y  $1.10^6$  ufc/ml mediante recuento en cámara Thoma, siguiendo la metodología especificada en el apartado 12.1.1.
- Para comprobar la concentración real de cada una de las soluciones madre preparadas, sembrar cada una, siguiendo la metodología del apartado 14.2.
- Preparar matraces Erlenmeyer con 50 ml del mejor medio, e inocular en cada uno las diferentes soluciones madre por duplicado.
- Incubar a  $25 \pm 1$  °C y 150 rpm durante el tiempo necesario para obtener la máxima producción del antagonista. Sembrar cada matraz Erlenmeyer siguiendo la metodología del apartado 14.2.

## **20. Determinación de la influencia del medio de cultivo en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) utilizada como cultivo estárter para inocularlo en el fermentador.**

La inoculación de la cepa *C. sake* (CPA-1) en fermentador a partir de un cultivo estárter mejora el crecimiento según referencias bibliográficas (Stanbury *et al.*, 1995), por lo que en esta parte de la metodología se realizan pruebas para determinar el mejor medio de crecimiento del cultivo estárter.

### **METODOLOGÍA**

- Se parte de cultivos jóvenes, para lo cual se siembra el antagonista en tubos con medio NYDA, se pone a incubar a  $25 \pm 1$  °C el tiempo en que el microorganismo está en su mayor producción y crecimiento, con éste se procede a preparar la solución madre.
- Para la preparación de la solución madre del tubo de NYDA con el antagonista, tomar con el asa, previamente esterilizada a la llama del mechero, una cantidad de inóculo cargado, disolver en 4,5 ml de solución tampón hasta llegar a obtener una solución muy concentrada. De esta solución concentrada inocular 0,5 ml en cada matraz Erlenmeyer con medio NYDB preparado siguiendo la metodología del apartado 2.2, y en el mejor medio de cultivo obtenido.
- Colocar los matraces Erlenmeyer inoculados en un orbital incubador a  $25 \pm 1$  °C, a 150 rpm, el tiempo necesario para obtener la máxima producción del antagonista.
- Centrifugar a 7000 rpm a 15 °C, por 10 min en la centrífuga Beckman. La fracción líquida se rechaza y la sedimentada que es el microorganismo es redisuelta con solución tampón.
- A partir de las muestras de antagonista crecido en diferentes medios, se prepara la solución madre por recuento en cámara Thoma siguiendo la metodología explicado en el apartado 12.1.1.
- La solución madre que se utilizará para inocular en el fermentador, se siembra también en placas de NYDA, siguiendo la primera parte de la metodología del apartado 14.2.
- De los tubos que contienen las soluciones madre o cultivos estárter producidos en distintos medios de cultivo, se agitan y homogeneizan bien. Se inoculan 5 ml de estas soluciones en el recipiente del fermentador modular Gallenkamp con capacidad de 5 l que contiene 3 l de medio de crecimiento.
- Fijar en el fermentador las condiciones de una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, con un suministro de flujo de aire constante a razón de 300 ml/min y una en agitación de 200 rpm y someter a crecimiento el antagonista.

- Una vez cumplido el tiempo de crecimiento, se extrae del fermentador una alícuota de 0,5 ml y se siembra siguiendo la parte de la metodología del apartado 14.2.

## **21. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).**

### **21.1. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) a diferentes tiempos.**

Es necesario estudiar el comportamiento del microorganismo durante todo su crecimiento a temperatura ambiental constante, es decir hacer su curva de crecimiento para determinar a que tiempo se encuentra en fase exponencial logarítmica de mayor crecimiento, fase estacionaria y cuando comienza su fase de declinación o muerte y saber a qué tiempo se obtiene la mayor masa microbiana del antagonista.

#### **METODOLOGÍA**

- Preparar el medio según la metodología correspondiente.
- Inocular 0,5 ml de la cepa *C. sake* (CPA-1) a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2.
- Someter por duplicado los matraces Erlenmeyer a crecimiento por agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario hasta llegar a su fase de declinación, tomando a cada intervalo de tiempo establecido alícuotas para sembrar de la siguiente manera:
- **Cero horas de crecimiento:** agitar durante 5 min, todos los matraces Erlenmeyer inoculados y tomar 0,5 ml de cada uno de ellos y sembrar las diluciones D3 y D4 siguiendo la metodología del apartado 14.2.
- **Veinticuatro horas de crecimiento:** tomar alícuotas de 0,5 ml de cada matraz Erlenmeyer sometido a crecimiento durante 24 h y sembrar las diluciones D4 y D5, por duplicado siguiendo la metodología de la anterior siembra.
- **Cuarenta y ocho horas de crecimiento:** tomar alícuotas de 0,5 ml de cada matraz Erlenmeyer sometido a crecimiento durante 48 h y sembrar las diluciones D5 y D6, por duplicado.
- **Cincuenta y seis horas de crecimiento:** tomar alícuotas de 0,5 ml de cada matraz Erlenmeyer sometido a crecimiento durante 56 h y sembrar las diluciones D4 y D5, por duplicado.

- Con los resultados obtenidos, se realizan gráficos con las curvas del crecimiento del antagonista.

### **21.2. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) a diferentes temperaturas.**

Una vez determinado cual es el mejor medio de crecimiento para el antagonista, se realizan experiencias de curvas de crecimiento a pH 7 y a diferentes temperaturas, con el objetivo de determinar la temperatura más óptima para el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el referido medio de crecimiento.

Se realizan pruebas de crecimiento a 20, 25, 30 °C, y a 22, 24, 26 °C, a diferentes tiempos, para poder graficar su curva de crecimiento a las diferentes temperaturas.

### **METODOLOGÍA**

- Preparar el medio siguiendo la metodología correspondiente.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2.
- Colocar por duplicado los matraces Erlenmeyer en el incubador orbital a temperaturas de 20, 25, 30 °C.
- Realizar otra prueba colocando por duplicado los matraces Erlenmeyer en incubador orbital a temperaturas de 22, 24, 26 °C.
- Incubar a 150 rpm durante el tiempo necesario hasta que el crecimiento del antagonista comienza a declinar a las diferentes temperaturas, tomando a cada intervalo de tiempo establecido alícuotas para sembrar, siguiendo la metodología del apartado 21.1.

### **21.3. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) en medio melaza de caña de azúcar urea.**

Una vez determinada experimentalmente la influencia de las elevadas concentraciones de melaza de caña de azúcar en el medio de crecimiento en el desarrollo del antagonista, debido a que su variación de concentraciones en el medio determina una disminución de la actividad de agua ( $a_w$ ), se realizan curvas de crecimiento del antagonista en el mejor con el objetivo de establecer la influencia de los mismos durante las diferentes horas del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1).



## METODOLOGÍA

- Se preparan los medios de melaza en los que se ha variado la concentración melaza de caña de azúcar, siguiendo la metodología explicada en el apartado 8, leer sus  $a_w$  en la Novacina.
- Inocular 0,5 ml del antagonista a partir de la solución madre preparada siguiendo la metodología del apartado 12.1.2.
- Incubar los matraces Erlenmeyer a crecimiento por duplicado en agitación a 150 rpm durante el tiempo necesario hasta que el crecimiento del antagonista comienza a declinar su crecimiento, tomando a cada intervalo de tiempo establecido alicuotas para sembrar de la siguiente manera:
- **Cero horas de crecimiento:** Una vez que se ha inoculado el antagonista, agitar y tomar 0,5 ml de alicuotas de cada matraz Erlenmeyer que contiene medio a diferentes  $a_w$ , y sembrar en placas de NYDA las diluciones D2 y D3, por duplicado siguiendo la metodología del apartado 14.2. Tomadas las alicuotas, se introducen los matraces Erlenmeyer en los recipientes de vidrio que contienen las soluciones de glicerol a las diferentes  $a_w$ , preparadas siguiendo la metodología del apartado 8.7 y llevar los recipientes con los matraces Erlenmeyer al orbital que está a 25 °C y someter a crecimiento a 150 rpm
- **Catorce horas de crecimiento:** Transcurridas 14 h de crecimiento, sacar los recipientes de vidrio con los matraces Erlenmeyer del orbital, llevarlos a nevera para frenar el crecimiento. Tomar una alicuota de 0,5 ml de cada uno de ellos, llevar nuevamente al orbital para que continúen con el crecimiento, y sembrar en placas de NYDA las diluciones, D3 y D4 por duplicado siguiendo la metodología del apartado 14.2.
- **Veinticuatro horas de crecimiento:** A las 24 h de crecimiento, sacar los recipientes de vidrio con los matraces Erlenmeyer del orbital, llevarlos a nevera, tomar 0,5 ml de cada uno de ellos, llevar nuevamente de inmediato al orbital para que continúe el crecimiento, y sembrar en placas de NYDA las diluciones, D3 y D4 por duplicado.
- **Treinta y ocho horas de crecimiento:** A las 38 h de crecimiento, hacer el mismo procedimiento antes indicado, sembrando las diluciones D5 y D6 por duplicado para los medios de melaza con  $a_w$ , 99,9, 97,2, 96,8, las diluciones D3 y D4 de los matraces Erlenmeyer con  $a_w$ , 96,6 porque se observa que hay un menor crecimiento.
- **Cuarenta y ocho horas de crecimiento:** A las 48 h de crecimiento, repetir el proceso antes indicado, sembrando las mismas diluciones detalladas en las diferentes  $a_w$ , de las 38 h de crecimiento.

**Cincuenta y seis horas de crecimiento:** A las 56 h de crecimiento, repetir el proceso antes indicado y sembrar las diluciones D2, D3 y D4.

- Tener la precaución que durante toda la experiencia se mantenga la temperatura constante a  $25 \pm 1$  °C.
- Incubar todas las placas sembradas, luego realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro.
- Con los resultados obtenidos, se realizan tablas y gráficos comparativos de la curva de crecimiento del antagonista a las diferentes  $a_w$ .

#### **21.4. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio melaza de caña de azúcar y urea en fermentador.**

El objetivo de esta parte experimental, es realizar tanto con el medio de melaza de caña de azúcar como con el medio melaza de remolacha azucarera con urea, curvas de crecimiento del antagonista a temperatura ambiental constante ( $25$  °C  $\pm 1$  °C) en fermentador, para determinar su curva de crecimiento, simulando las condiciones lo más aproximadamente posible a lo que sería su producción a nivel industrial en un fermentador, pero a pequeña escala; 3 l y hacer la curva de crecimiento del antagonista, para poder determinar el tiempo en que se obtiene la mayor masa microbiana.

#### **METODOLOGÍA**

- La preparación inóculo del antagonista se realiza partiendo de un cultivo estérter crecido en medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, preparado siguiendo la metodología del apartado 20.
- De esta suspensión resultante inocular 5 ml en el recipiente del fermentador modular de la casa Gallenkamp con capacidad de 5 l que contiene 3 l de volumen de medio de crecimiento melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l.
- Conectar el fermentador y mantener agitando durante 5 min el medio. Desconectar, llevar a la cabina de flujo laminar y tomar del medio agitado 0,5 ml de alícuota y sembrar las diluciones, D1, D2 y D3 por duplicado.
- Conectar nuevamente el fermentador a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, con un suministro de flujo de aire constante a razón de 300 ml/min y en agitación a una velocidad de 200 rpm. Tomar alícuotas para sembrar a las diferentes horas de crecimiento de la siguiente forma:

- Tomar 2 alícuotas de 0,5 ml de muestra a las 13, 18 y 24 h de crecimiento, siguiendo el mismo proceso, llevar el fermentador a una cabina de flujo laminar para evitar la contaminación del medio de crecimiento, sembrar las diluciones D2, D3, D4 y D5 por duplicado.
- Tomar 2 alícuotas a las 37, 42, 48, 61 h de crecimiento con la precaución de no contaminar el medio de crecimiento y sembrar las diluciones D3, D4, D5 y D6 por duplicado.
- Tomar 2 alícuotas a las 67, 72, 85, 90 y 115 h de crecimiento y sembrar D2, D3, D4 y D5, por duplicado.
- Para la siembra, incubación y lectura de las placas seguir la parte de la metodología del apartado 14.2.
- Con los resultados obtenidos, se realizan tablas y gráficos comparativos de las curvas de crecimiento del antagonista en los diferentes tiempos.

### **21.5. Dinámica poblacional del crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio melaza de remolacha azucarera en fermentador.**

El objetivo de esta parte experimental es realizar la curva de crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en medio de melaza de remolacha azucarera en fermentador a temperatura ambiente constante a las mismas concentraciones del medio melaza de caña de azúcar y urea, sin modificaciones del pH, y a las mismas condiciones de aireación y velocidad de agitación del anterior crecimiento en fermentador y establecer comparaciones entre los dos medios de crecimiento.

#### **METODOLOGÍA**

- La preparación inoculo del antagonista se realiza partiendo de un cultivo estárter crecido en medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l, preparado siguiendo la metodología del apartado 20.
- El crecimiento se realiza siguiendo la misma metodología utilizada en el crecimiento de la cepa *C. sake* (CPA-1) en fermentador en medio melaza de caña de azúcar 40 g/l y urea 1,2 g/l.

### **21.6. Dinámica poblacional de la cepa *C. sake* (CPA-1) sobre la superficie de manzana “Golden Delicious” en diferentes condiciones de atmósferas**

## controladas

Este ensayo pretende determinar el efecto de las condiciones de frigoconservación en atmósferas controladas sobre la evolución de la población de la cepa *C. sake* (CPA-1) desarrollados sobre la superficie de la manzana “Golden Delicious”, para lo cual se realizan pruebas de crecimiento en diferentes atmósferas de oxígeno y dióxido de carbono en las condiciones más adversas posibles en que sería necesaria la actuación del microorganismo antagonista para el control del ataque de *P. expansum* en fruta que tenga heridas y en presencia del patógeno.

## METODOLOGÍA

### 1. Preparación del antagonista.

- La preparación del microorganismo antagonista se realiza en un fermentador modular Gallenkamp, para lo cual se prepara una disolución concentrada de antagonista suspendida en solución tampón a partir de un cultivo estarter crecido en medio melaza de caña de azúcar y urea, preparado siguiendo la metodología del apartado 20.
- De esta suspensión resultante inocular 5 ml en el recipiente del fermentador que contiene 8 l de medio de crecimiento melaza 40 g/l y urea 1,2 g/l esterilizado a 121° C durante 15 min.
- Se incuba durante el tiempo que consideramos que el antagonista está en el punto máximo de crecimiento exponencial, a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, con un suministro de flujo de aire constante a razón de 300 ml/min y en agitación a una velocidad de 200 rpm.
- Transcurrido este tiempo de crecimiento, el contenido del fermentador es centrifugado a 7000 rpm a 15 °C, por 10 min en la centrífuga Beckman. La fracción líquida se rechaza y la sedimentada que es el microorganismo es redisuelta con solución tampón.
- A partir de esta solución concentrada y mediante recuento en cámara Thoma siguiendo la metodología del apartado 12.1.1, preparar una solución con una concentración de  $2.10^6$  ufc/ml, para un volumen de 100 l que se colocará en un recipiente para bañar la fruta.

### 2. Baño de la fruta.

- Se lava la fruta con agua corriente, un número de 6 unidades por repetición y tres repeticiones por cada condición atmósfera de frigoconservación.
- Se hacen dos agujeros con punzones, uno a cada lado de la parte meridional de las manzanas, con la precaución que todos se realicen con igual profundidad.
- Colocar las manzanas en cajas, las cuales se sumergen en la bañera que contiene la solución con

antagonista durante 30 s, por cada repetición y en orden. Se dejan secar.

- Una vez secas, colocar 6 frutas dentro de una bolsa de plástico con orificios para que puedan respirar.
- Cada bolsa se identifica con la fecha del baño, condición de atmósfera controlada y número de repetición.
- Se coloca en cada microcámara un número de 6 unidades por repetición y tres repeticiones por cada condición de atmósfera controlada.

El estudio del comportamiento de la población se realiza mediante el recuento de microorganismos viables durante un período de 90 días, con siembras cada mes.

### 3. Siembra del antagonista.

- Se siembra primero la concentración inicial del antagonista, para lo cual se toman seis manzanas bañadas.
- Pesar dos manzanas, y separar la piel de la pulpa, pelándolas en condiciones de máxima asepsia bajo un flujo laminar. Las pieles se colocan dentro de un matraz Erlenmeyer que contienen 200 ml de tampón.
- Para obtener el microorganismo de la superficie de la piel, se realiza un proceso de extracción de la siguiente forma: el matraz se coloca en un orbital agitador durante 20 min a 150 rpm, a continuación se traslada a un baño de ultrasonidos de la marca Selecta durante 10 min, se extrae una alícuota de 0,5 ml de esta suspensión y se introduce en un tubo de ensayo con 4,5 ml de solución tampón que corresponde a la dilución D1 y que es el punto de partida para las restantes diluciones a realizar. Para cada matraz Erlenmeyer se efectúan dos bancos de diluciones.
- Se preparan de igual forma partiendo de la D1 y así sucesivamente hasta la dilución adecuada en función de la concentración del antagonista y cada una de estas diluciones se siembran en dos placas Petri con NYDA y estreptomycinina previamente identificadas, para lo cual en cada placa se inoculan 0,1 ml de la dilución correspondiente y luego se reparte de modo uniforme por toda la placa con la ayuda de una asa de Drigalski.
- Las placas se incuban a  $25 \pm 1$  °C durante 48 h, a continuación se procede al recuento del número de colonias que se desarrollan en cada placa y en cada dilución. Para cálculos posteriores se eligen las diluciones que contienen entre 30 y 300 colonias.
- A los 15 días, se procede a abrir las microcámaras que corresponden a la primera repetición, y con las diferentes condiciones de concentración de oxígeno y dióxido de carbono, y sacar las

bolsas.

- Se realiza la siembra del microorganismo de la pulpa de la fruta siguiendo la misma metodología antes explicada.
- Igual proceso hacer a los 30, 60 y 90 días.
- De esta manera se desea obtener la evolución de la población del antagonista sobre la superficie del fruto. Sin embargo, dada la dificultad de realizar una medida fácil y exacta de la superficie de una fruta y dado que hay una relación directa entre la superficie del fruto y su peso, los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de fruta (ufc/g).
- Con los resultados obtenidos, se realizan tablas y gráficos comparativos del crecimiento y viabilidad del antagonista a cada temperatura.

## **22. Determinación de la capacidad antagónica de la cepa *C. sake* (CPA-1) en el control del *P. expansum* en manzanas “Golden Delicious”.**

### **22.1. Ensayo a nivel secundario para la evaluación de la efectividad antagónica.**

#### **22.1.1. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea y melaza de remolacha azucarera con urea a diferentes concentraciones y $a_w$**

El objetivo de este ensayo de efectividad a nivel secundario es determinar la concentración mínima efectiva de la cepa *C. sake* (CPA-1) así como establecer comparaciones de efectividad del microorganismo crecido en medios de melaza de caña de azúcar a diferentes concentraciones con urea y melaza de remolacha azucarera a diferentes concentraciones con urea, es decir a diferentes  $a_w$ .

Todos estos ensayos se basan en la metodología descrita por Janisiewicz (1987) y puesta a punto por Usall (1995). Se realiza sobre manzanas de la variedad “Golden Delicious” sanas y con un grado no elevado de madurez.

### **METODOLOGÍA**

- Las frutas se lavan con agua corriente y se dejan secar sobre papel filtro, luego a cada fruta se le

practica dos agujeros de 3 x 3 x 3 mm en la misma cara de la manzana, uno en la parte media superior y otra en la parte media inferior.

- La unidad de muestra está compuesta por cuatro frutas y por cada tratamiento se realizan tres repeticiones, así como por cada concentración de antagonista o el medio en donde ha crecido el microorganismo que corresponde a un tratamiento diferente.
- Generalmente se estudian dos concentraciones de tratamiento por microorganismo, correspondientes a  $2 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^7$  ufc/ml.
- El antagonista para cada prueba de efectividad, es crecido en medios en los cuales se a inoculado una solución madre preparada por transmitancia, siguiendo la metodología explicada en el apartado 12.1.2. de la cual se han inoculado 0,5 ml de esta suspensión previamente homogénea en cada matraz Erlenmeyer que contiene 50 ml de medio de crecimiento o de NYDB estéril.
- Los medios de crecimiento en los que se inoculan son: melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; melaza de caña de azúcar 250 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de caña de azúcar 350 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de remolacha azucarera 250 g/l con urea 1,2 g/l, melaza de remolacha azucarera 350 g/l con urea 1,2 g/l, preparados siguiendo las metodologías del apartado 8 y en NYDB preparados siguiendo la metodología del apartado 2.2.
- Colocar los matraces Erlenmeyer en el orbital agitador e incubar a  $25 \pm 1$  °C durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista a 150 rpm.
- A continuación centrifugar el contenido cada uno de los medios de crecimiento con el antagonista en la centrífuga Beckman, a 7000 rpm a 10 °C por 10 min. La fracción líquida se descarta y el sedimento que es el microorganismo se redisuelve con solución tampón estéril, obteniéndose así una suspensión que varía de concentración según el medio de crecimiento.
- A partir de esta solución, se preparan las concentraciones correspondientes de  $2 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^7$  ufc/ml de cada muestra mediante recuento en cámara Thoma, explicada en el apartado 12.1.1.
- Acto seguido se inoculan 25 µl de cada concentración de antagonista crecido en cada medio, en cada uno de los agujeros hechos en la fruta de las tres repeticiones.
- Una vez seca la muestra en la fruta, inocular 0,20 µl de una suspensión titulada de la cepa *P. expansum*, en concentración de  $1 \cdot 10^4$  conidios/ml preparada siguiendo la metodología del apartado 12.2.

- Paralelamente se prepara una prueba de control con idénticas características que los tratamientos, pero sustituyendo la suspensión del microorganismo por solución tampón estéril.
- Las piezas de fruta se colocan en tres grupos de cuatro en el mismo tipo de alvéolo donde se embala comercialmente la fruta para su venta.
- Las tres repeticiones de un mismo tratamiento se sitúan en alvéolos diferentes.
- Una vez secos, los alvéolos se cubren con un plástico y luego se colocan en una caja de cartón con tapa.
- Las cajas se sitúan dentro de una sala climatizada y se incuban a  $20 \pm 1$  °C durante 7 días.
- La lectura de los resultados se realiza contando el número de orificios con lesión y midiendo el diámetro de las podredumbres después de 7 días de incubación en la sala climatizada.
- Los resultados de los diferentes tratamientos se comparan con el obtenido en la prueba control sin antagonista.

#### **22.1.2. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea y comparada con la efectividad del antagonista crecido a diferentes $a_w$ , modificadas con glicerol y glucosa.**

Una vez determinada la concentración mínima efectiva de la cepa *C. sake* (CPA-1), se realizan pruebas de efectividad secundaria del microorganismo antagonista crecido en medios de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l comparadas con efectividad del antagonista crecido en medio NYDB normal y NYDB con  $a_w$  baja, modificada con glucosa y glicerol.

Se realiza sobre manzanas de la variedad "Golden Delicious".

#### **METODOLOGÍA**

- Preparar el microorganismo antagonista para cada prueba de efectividad, partiendo de una solución madre preparada por transmitancia siguiendo la metodología explicada en el apartado 12.1.2, tomar 0,5 ml de esta suspensión previamente homogénea y sembrar a cada matraz Erlenmeyer que contiene 50 ml de medio de crecimiento.
- Los medios de crecimiento en los que se inoculan son: melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; preparado siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2; NYDB/glicerol  $a_w$ , 0,964 preparado siguiendo las metodologías del medio  $a_w$  5 del apartado 8.5; NYDB/glucosa  $a_w$ , 0,96 preparado siguiendo la metodología del medio  $a_w$  6 del apartado 8.6 y en NYDB preparado siguiendo la metodología del apartado 2.2.



- Colocar los matraces Erlenmeyer en el orbital agitador a 150 rpm e incubar a  $25 \pm 1$  °C durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista.
- Centrifugar, y realizar el mismo proceso detallado en el apartado: 22.1.1.

### **22.1.3. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea, melaza de remolacha azucarera con urea y combinación de las dos melazas.**

Se realiza otra prueba comparando la efectividad de la cepa *C. sake* (CPA-1) a nivel secundario, crecida en medios de melaza de caña de azúcar y urea, con melaza de remolacha azucarera y urea, con una mezcla de las dos melazas y urea y con NYDB.

### **METODOLOGÍA**

- Preparar el microorganismo antagonista crecido en los diferentes medios, partiendo de una solución madre preparada por transmitancia siguiendo la metodología explicada en el apartado 12.1.2, tomar 0,5 ml de esta suspensión previamente homogénea y sembrar a cada matraz Erlenmeyer que contiene 50 ml de medios de crecimiento o de NYDB estériles.
- Los medios de crecimiento en los que se inoculan son: melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l; preparado siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2, melaza de remolacha azucarera 40 g/l con urea 1,2 g/l; preparado siguiendo la metodología del medio ENR 52 del apartado 6.12.2, melaza de caña de azúcar 20 g/l con melaza de remolacha azucarera 20 g/l con urea 1,2 g/l preparado siguiendo la metodología del medio ENR 77 del apartado 6.14, y NYDB siguiendo la metodología del apartado 2.2.
- Colocar los matraces Erlenmeyer en el orbital agitador a 150 rpm e incubar a  $25 \pm 1$  °C durante el tiempo necesario para obtener una máxima producción del antagonista.
- Centrifugar, y realizar el mismo proceso detallado en el apartado: 22.1.1.

### **22.1.4. Ensayo de efectividad del antagonista crecido a diferentes horas, en medio melaza de caña de azúcar con urea.**

Establecida la concentración mínima efectiva de la cepa *C. sake* (CPA-1), se realizan pruebas de efectividad secundaria del microorganismo antagonista crecido en diferentes tiempos en medios de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l y en medio NYDB.

Se realiza sobre manzanas de la variedad "Golden Delicious".

## **METODOLOGÍA**

- Preparar el microorganismo antagonista para cada prueba de efectividad crecido en medios de melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l, preparado siguiendo la metodología del medio ENR 22 del apartado 6.5.2, y NYDB preparado siguiendo la metodología del apartado 2.2, a los cuales se les ha inoculado 0,5 ml de una solución madre preparada por transmitancia siguiendo la metodología explicada en el apartado 12.1.2.
- Preparar un matraz Erlenmeyer para cada tiempo de crecimiento que se quiere hacer las pruebas de efectividad, y sembrar el antagonista a diferentes horas, con el objetivo de sacarlos todos al mismo tiempo pero con diferentes horas de crecimiento.
- Colocar los matraces Erlenmeyer en el orbital agitador a 150 rpm e incubar a  $25 \pm 1$  °C.
- Sacar los matraces Erlenmeyer con antagonista crecidos en medio melaza de caña de azúcar 40 g/l con urea 1,2 g/l con 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 h de crecimiento y con antagonista crecido en NYDB con 24, 36 y 48 h de crecimiento.
- Centrifugar, y realizar el mismo proceso detallado en el apartado: 22.1.1.

### **22.1.5. Ensayo de efectividad del antagonista crecido en medio melaza de caña de azúcar con urea sobre manzana mantenida en condiciones de frigoconservación.**

El objetivo de este ensayo es determinar la capacidad antagonista de la cepa *C. sake* (CPA-1) frente al *P. expansum* en condiciones comerciales de frigoconservación.

La prueba se realiza sobre fruta sana y con un grado de madurez adecuado para su conservación en cámaras frigoríficas.

- La fruta se limpia, agujerea e inocula de la misma forma descrita en el apartado 22.1.1.
- La unidad de muestra está compuesta por 10 piezas de fruta y por cada tratamiento se realizan tres repeticiones.
- El microorganismo crecido en diferentes medios se estudia su capacidad antagonista a dos concentraciones:  $2 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^7$  ufc/ml, escogidas tras el análisis de los resultados obtenidos por

Usall (1995) en los ensayos de efectividad a nivel secundario y a temperatura ambiente de la cepa *C. sake* (CPA-1) crecida en medio de NYDB.

- Las piezas de fruta se colocan en grupos de 10 en el mismo alvéolo que se embalan las frutas para su comercialización, se cubren con plástico y se colocan en cajas de cartón con tapa.
- Las repeticiones de un mismo tratamiento se sitúan en cajas diferentes y las mismas se colocan en una cámara frigorífica al azar en las condiciones de frío normal que se detallan a continuación:

#### FRÍO NORMAL

- Temperatura 0 - 1 °C,
- Humedad relativa 90 - 98 %
- Concentración de oxígeno 21 %
- Tiempo de almacenamiento 30 y 60 días
- La lectura de los diámetros de podredumbre y número de fruta podrida se hace a: 30 y 60 días de conservación en cámaras de frigoríficas.

## 23. Determinación del estado de madurez de la fruta.

Para poder determinar el grado de madurez de la fruta que se utiliza en los diferentes ensayos, se toman diez frutos de cada lote utilizado y se determina:

### 23.1. Peso y calibre.

Son parámetros que dan idea del tamaño del fruto y sirven para realizar una corrección en el valor obtenido de dureza.

#### METODOLOGÍA

- Pesar los frutos de uno en uno en una balanza de precisión de  $\pm 0,1$  g, y expresar el resultado en gramos.
- El calibre se determina mediante un calibrador pie de rey, midiendo el diámetro de la zona ecuatorial del fruto, el resultado se expresa en centímetros.

### 23.2. Dureza.

Para medir el valor de la dureza se utiliza un penetrómetro que en realidad es un dinamómetro, ya

que se basa en la resistencia que ofrece a la compresión un muelle que va unido a un puntal de diámetro conocido, que es el que se introduce en la carne de la fruta. Los diámetros del puntal están normalizados siendo de 11 mm para las manzanas.

En el presente estudio se utiliza un penetrómetro Effegi provisto de una escala graduada sobre la que se realiza la lectura en kg.

Las diversas partes del fruto no tienen una dureza uniforme, pudiendo haber diferencias de 0.5 kg entre la cara coloreada y la cara verde. Por este motivo se realizan dos medidas de cada fruto y se calcula la media de ambas lecturas.

## **METODOLOGÍA**

- Para determinar la dureza es necesario extraer previamente una capa muy fina de piel en dos puntos de la zona ecuatorial del fruto equidistantes entre sí, con la finalidad de paliar al máximo la influencia de la orientación del fruto (caras soleadas y sombrías).
- Luego colocar el puntal en la zona donde se ha eliminado la piel y progresivamente se va penetrando en la pulpa del fruto hasta llegar a una marca rallada existente en el mismo puntal, en ese momento la aguja marca la resistencia al penetrómetro en la escala correspondiente.

### **23.3. Sólidos solubles.**

Los sólidos solubles se miden con un refractómetro tipo Abbe, que lo que aprecia es la desviación experimentada por la luz polarizada al atravesar una solución (en este caso son unas gotas de zumo de fruta). La desviación se mide sobre la escala graduada en grados Brix.

La lectura realizada corresponde realmente a los sólidos solubles que en la práctica se identifican con los azúcares ya que éstos constituyen aproximadamente un 80 % del total de sólidos.

## **METODOLOGÍA**

- Cortar de cada manzana una sección y extraer la parte del corazón y semillas, para evitar errores en la lectura.
- Licuar los trozos de los 10 frutos extraídos en forma conjunta.
- Calibrar el refractómetro, colocando unas gotas de agua en el lugar de la medición del equipo y llevando a cero.
- Mediante una pipeta, tomar unas gotas de zumo y colocarlos en el lugar adecuado del refractómetro y proceder a leer el valor de sólidos solubles correspondientes.

- El refractómetro da la lectura del índice de refracción en °Brix.

### 23.4. Acidez.

Para obtener el valor de acidez de la fruta, se basa en una simple reacción de neutralización entre un ácido y una base normalizadas, con la presencia de un indicador.

El ácido que mayoritariamente está presente en las manzanas es el ácido málico, y la base que se utiliza para su neutralización es el hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N con el indicador fenolftaleína que es indicador que vira a rojo en medio básico.

Para la titulación con el NaOH se procede de la siguiente manera:

#### METODOLOGÍA

- Del zumo licuado de una sección de cada una de las 10 manzanas a analizar, se toman 10 ml con una pipeta y se colocan en un vaso de precipitados.
- Añadir a esta solución 10 ml de agua destilada y unas gotas de fenolftaleína.
- Proceder a neutralizar el zumo con solución de NaOH 0,1 N, gota a gota, hasta que la solución cambie de incoloro al primer color rosa salmón, que es el punto de neutralización.
- Multiplicar los mililitros de NaOH utilizados en la valoración, por el factor para la conversión a gramos de ácido málico.

$$\text{Acidez (en gramos de ácido málico)} = \text{ml NaOH } 0,1 \text{ N} \times 0,67$$

### 24. Tratamiento estadístico

Con los datos de los diámetros de podredumbre obtenidos en los diferentes ensayos de efectividad a nivel secundario del antagonista, se realiza un análisis de varianza con el programa informático SAS.

La separación de las medias se realiza con el Test de Rango Múltiple de Duncan.

