



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE INGENIERO EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

Aislamiento y clasificación de mohos y levaduras de subproductos de mango.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Guevara Sánchez, Diego Javier

DIRECTOR: Hualpa Salinas, Diana Inés, Ing

LOJA- ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Ingeniera

Diana Inés Hualpa Salinas

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “Aislamiento y clasificación de mohos y levaduras de subproductos de mango” realizado por el profesional en formación: Diego Javier Guevara Sánchez; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, 26 de agosto de 2013

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Diego Javier Guevara Sánchez declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Autor: Diego Javier Guevara Sánchez

C.I: 1104522741

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de fin de carrera a mis padres y a mi tío Patricio, los cuales siempre por la palabra y el ejemplo me han incentivado a ser mejor en cada etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Expreso efusivamente mi agradecimiento a Dios por brindarme sus infinitas bendiciones cada día de mi vida, por darme una familia que me enseñó principios de honestidad, trabajo, humildad y perseverancia.

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja que por medio de sus docentes me ha brindado conocimiento y experiencia en el campo de la ciencia de los alimentos, especialmente a la Ing. Diana Hualpa ya que con su guía se llevó a cabo de mejor manera el desarrollo de este trabajo. También expreso mi gratitud a todos mis compañeros de clase, con los cuales compartimos tiempos de enseñanza, apoyo y diversión.

Diego J. Guevara

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	pág.
PRELIMINARES	
Caratula	i
Certificación	ii
Declaración de autoría y cesión de derechos	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Nomenclatura	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1. Introducción	1
CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Generalidades del mango	3
2.1.1 Variedades	3

2.1.2	Sub-producto	4
2.2	Mohos y Levaduras	4
2.3	Micotoxinas	7
2.4	Recuento de mohos y levaduras	7
2.5	Aislamiento	7
2.6	Clasificación	8
2.6.1	Macroscópicos	8
2.6.2	Microscópicos	8
2.7	Crioconservación	9
2.7.1	Edad de las células	9
2.7.2	Velocidad en la congelación y descongelación	10
2.7.3	Temperatura de almacenamiento	10
2.7.4	Uso de agentes crioprotectores	10

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

3.1	Objetivo general	12
3.2	Objetivo específico	12

CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1	Reactivos y equipos	13
4.1.1	Reactivos	13
4.1.2	Equipos	13
4.2	Muestra	14
4.2.1	Muestreo y preparación de la muestra	14

4.3	Recuento de mohos y levaduras	16
4.4	Aislamiento de mohos y levaduras	17
4.5	Clasificación Morfológica	18
4.5.1	Clasificación Macroscópica	18
4.5.2	Clasificación Microscópica	18
4.6	Identificación por la técnica de Ridell	18
4.7	Identificación de levaduras	19
4.8	Crioconservación	19
4.8.1	Preparación de material	19
4.8.2	Preparación de cultivos	20
4.8.3	Preparación del inóculo	20
4.9	Control de viabilidad	20

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1	Recuento Inicial	22
5.2	Colonias aisladas	23
5.3	Identificación y clasificación de mohos y levaduras	23
5.3.1	<i>Candida Krusei</i>	24
5.3.2	<i>Oidiodendron griseum</i> robak	26
5.3.3	<i>Cryptococcus laurentii</i>	27
5.3.4	<i>Geotrichum Candidum</i> Link	28
5.3.5	<i>Pichia fermentans</i>	30
5.4	Control de Viabilidad	31

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	33
CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES	34
CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 9: ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

		pág
Tabla 1	Resultados del recuento inicial	22
Tabla 2	Incidencia de especies fúngicas en los distintos tratamientos	23
Tabla 3	Porcentajes de viabilidad	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág
Figura 1 Estructuras típicas de mohos en alimentos	5
Figura 2 Estructuras de algunos géneros de levaduras	6
Figura 3 Tipos de esporas y estructuras formadoras de esporas	8
Figura 4 Esquema de preparación de la muestra	15
Figura 5 Cepa de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	17
Figura 6 Características macro y microscópicas de <i>Candida krusei</i>	24
Figura 7 Características macro y microscópicas de <i>Oidiodendron griseum</i> robak	26
Figura 8 Características macro y microscópicas de <i>Cryptococcus laurentii</i>	27
Figura 9 Características macro y microscópicas de <i>Geotrichum Candidum</i> Link	29
Figura 10 Características macro y microscópicas de <i>Pichia fermentans</i>	30

ÍNDICE DE ANEXOS

	pág
ANEXOS	
Anexo 1 Esquema de técnica de vertido en placa	41
Anexo 2 Técnica de Ridell	42
Anexo 3 Recuento inicial de mohos y levaduras	43
Anexo 4 Crio conservación de cepas fúngicas	44
Anexo 5 Ficha técnica de <i>Candida Krusei</i>	45
Anexo 6 Ficha técnica de <i>Oidiodendron griseum</i> robak	46
Anexo 7 Ficha técnica de <i>Cryptococcus laurentii</i>	47
Anexo 8 Ficha técnica de <i>Geotrichum Candidum</i> Link	48
Anexo 9 Ficha técnica de <i>Pichia fermentans</i>	49

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer la calidad micológica de subproductos de mango y verificar la presencia o ausencia de mohos productores de micotoxinas o aquellos que producen degradación.

Se trabajó con muestras de subproducto de mango (piel y pulpa adherida a la piel) generadas en la empresa “Agroficial” (Guayaquil-Ecuador). El recuento realizado a la muestra fresca y deshidratada a 40° C tuvo un recuento de 51000 UFC/g, mientras que la muestra deshidratada a 60° C presento un recuento de 67000 UFC/g.

Se aislaron un total de 5 colonias, las cuales de acuerdo a su taxonomía fueron clasificadas e identificadas como: *Candida krusei*; *Oidiodendron griseum* robak; *Cryptococcus laurentii*; *Geotrichum Candidum* Link; *Pichia fermentans*. Estos mohos y levaduras fueron crio conservados a -80°C y el porcentaje de viabilidad fue superior al 80% para cada cepa fúngica.

Los subproductos de mango presentaron un desarrollo de mohos y levaduras muy común en productos agrícolas, entre los cuales no se encontró mohos productores de micotoxinas, no obstante se debe considerar la acción de *Cándida krusei*; *Oidiodendron griseum* robak; *Geotrichum Candidum* Link y *Pichia fermentans*, debido a que éstas al ser adicionadas en matrices alimentarias pueden causar reacciones desfavorables; disminuyendo la vida útil del producto final.

Palabras claves: subproducto, mohos, levaduras, aislamiento, crio conservación.

ABSTRACT

The main objective of this current project is to know the mycological quality of mango-sub products, and to verify the presence or absence of molds which produce mycotoxins and degradation.

Samples of mango-sub products were analyzed (shell and pulp attached to the shell). These samples were provided by an enterprise called "Agroficial" located in Guayaquil-Ecuador. The count carried out at the fresh sample and dehydrated to 40 Celsius degrees had a count of 51000 UFC/g; meanwhile, the 60 Celsius-degree sample presented a count of 67000 UFC/g.

A total amount of 5 colonies were isolated, which according to their taxonomy were classified and analyzed as: *Candida krusei*; *Oidiodendron griseum robak*; *Cryptococcus laurentii*; *Geotrichum Candidum Link*; *Pichia fermentans*. These molds and yeasts were cryo-preserved to -80 Celsius degrees, and the percentage of viability was greater than 80% for each fungal strain.

The mango sub-products presented a development of molds and yeast particularly in agricultural products had no presence of mycotoxins. Nevertheless, it is necessary to consider the action of *Cándida krusei*; *Oidiodendron griseum robak*; *Geotrichum Candidum Link* and *Pichia fermentans*, due to the fact that these last when being added to food matrices can cause adverse reactions; decreasing the useful life of the final product.

Key words: byproduct, molds, yeasts, isolation, cryo preservation

NOMENCLATURA

UFG/g : Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra.

PDA : Agar papa dextrosa.

V/V : Relación volumen-volumen.

aw : Actividad de agua.

mL : Mililitro de solución.

MEA : Agar extracto de malta.

min : Tiempo en minutos

seg : Tiempo en segundos

1. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L) es una variedad que contiene excelentes propiedades sensoriales y nutricionales, las cuales son altamente valoradas por la industria alimentaria para la transformación de la fruta en productos como: bebidas, purés y conservas (Ribeiro et al. 2008). Este procesamiento a su vez genera altas cantidades de subproductos, especialmente lo que es piel y semillas los cuales se ha demostrado que son materia prima con una gran variedad de compuestos beneficiosos para la salud humana (Elleuch et al. 2011).

Actualmente se está prestando más atención a la valoración de subproductos agrícolas mediante la conversión de los mismos en ingredientes alimentarios y otros materiales de valor añadido, debido a que contienen varias sustancias valiosas como: azúcares, pigmentos, ácidos orgánicos, sabores y compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antimicrobiana (Lásztity et al. 1988). Estudios han demostrado que subproductos de mango, guayaba y maracuyá, son una fuente rica en fibra soluble e insoluble y con un alto contenido de polifenoles de 546mg/100g; 30mg/100g; 157g/100g, respectivamente (Martínez et al. 2012).

Estos productos agrícolas son susceptibles a la invasión por mohos y levaduras (Marasas et al. 2006), durante alguna de las etapas de producción, procesado, transporte y almacenamiento (Bullerman y Bianchini 2007), entre estos existen algunos mohos toxigénicos que tienen la capacidad de producir una variedad de metabolitos secundarios denominados micotoxinas (Drusch y Ragab 2003), las cuales son causantes de serias intoxicaciones al consumidor desde la gastroenteritis hasta el cáncer hepático (Fung y Clark 2004), las especies toxigénicas de mayor importancia pertenecen a tres géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Lazo y Sierra 2008).

De acuerdo a la FDA “la mayoría de micotoxinas son compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos o comida casera. A pesar de que los organismos de generación no pueden sobrevivir a la preparación de alimentos, la toxina preformada puede estar aún presente” (Tournas et al. 2001). De acuerdo al estudio realizado por Park (2002) las micotoxinas toleran temperaturas de hasta los 160° C con la cual solamente se logra una destrucción parcial de las mismas, esto quiere decir que la ausencia de hongos toxicogénicos no garantiza que un alimento esté libre de micotoxinas (Romero et al. 2005), pues las esporas que producen persisten aun cuando el hongo ha perdido su viabilidad (Doolotkeldieva 2010).

En un recuento anterior realizado en el laboratorio de microbiología de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja a subproductos de mango se reportó la presencia de 200 a >15000 UFC/g, por tanto en base a este elevado resultado es de suma importancia clasificar las diferentes especies de mohos y levaduras para determinar la presencia o ausencia de mohos toxigénicos y los que sean netamente mohos de descomposición, cuya finalidad posterior es estudiar sus características y efectos en los alimentos.

La Sección Departamental de Ciencias de Alimentos perteneciente al Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, en colaboración con la empresa “Agroficial” está llevando a cabo proyectos de desarrollo de ingredientes funcionales ricos en fibra y antioxidantes a partir de subproductos. Por tanto es necesario conocer la calidad micológica de estos subproductos a fin de definir si son o no confiables para ser utilizados como ingredientes alimenticios, los resultados también servirán para que las empresas puedan implementar las medidas de seguridad pertinentes para garantizar la inocuidad de los subproductos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DEL MANGO

El Mango (*Mangifera indica* L.) es una fruta tropical que pertenece a la familia de Anacardiaceae, con una producción mundial de más de 26 millones de toneladas en el 2004 (FAO 2011) y una importante pérdida post cosecha del 20-25% debido al ataque de mohos patógenos durante el manejo, almacenamiento y distribución, incluso en los países desarrollados (Kansci et al. 2003). Se ha demostrado que entre las frutas tropicales el mango es fuente de un alto valor nutritivo ya que contiene vitaminas y minerales esenciales para cubrir un gran porcentaje de los requerimientos diarios (Griesbach 2003).

2.1.1 Variedades

Mundialmente se cultiva algunas variedades de mango (Bally 2006) tales como: Ataulfo, Francis, Haden, Keitt, Kent, Tommy Atkins, siendo esta última la de mayor producción mundial para exportación (Griesbach 2003). Esta variedad presenta características físicas de un tamaño hasta 13 cm de largo con un peso máximo de 1.2 kg y con un promedio de 0.5 Kg, la forma es ovalada, la superficie de la fruta es lisa, con una cáscara gruesa y resistente al daño mecánico, el color predominante es anaranjado amarillo y el rubor es de rojo oscuro a rojo brillante, la pulpa es amarilla oscura con una textura firme ya que presenta abundancia de fibras finas (Lizada 1993; Ureña Bogantes et al. 2007).

2.1.2 Sub-producto

Los sub-productos son productos secundarios que se derivan de procesos de fabricación, por tanto viene a ser aquel que mediante reacciones químicas o rutas bioquímicas no es el producto principal que se desea (ONU 2009).

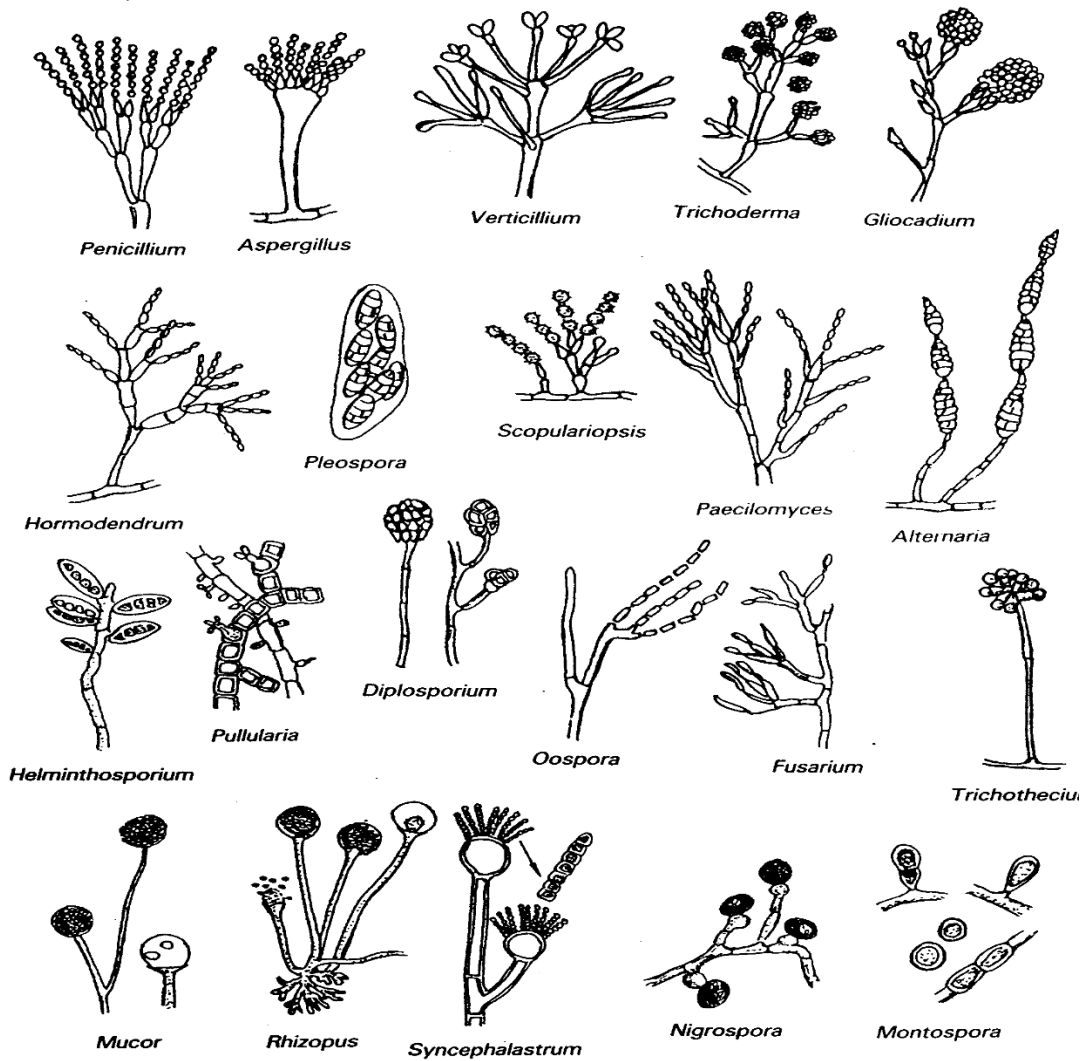
El proceso de industrialización de la fruta de mango genera de un 30-60% de subproducto (piel y pulpa adherida a la piel) (Beuchat y Cousin 2001), que generalmente son lanzados a la naturaleza o se utilizan como alimentación animal (Koubala et al. 2008). Actualmente hay un gran número de estudios en cuanto a los posibles usos de los subproductos de mango como aditivos alimentarios, debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes; saborizantes; colorantes; pectinas y espesantes (Ayala-Zavala et al. 2011). Por ejemplo se ha reportado que la cáscara puede ser una potencial fuente de pectina de alta calidad y fibras dietéticas, mientras que la semilla es fuente de grasa (11-13%) y carbohidratos (6,56%) (Lásztity et al. 1988).

2.2 MOHOS Y LEVADURAS

Son microorganismos de estructura celular eucariota que pueden ser pluricelulares o unicelulares (Marasas et al. 2006). En la Figura 1 se indica algunas estructuras típicas de mohos los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, siendo estos los principales causantes del deterioro de los alimentos tanto en cereales, granos secos y frutas (Fugelsang 1997; Tournas et al. 2001), debido a su gran versatilidad para adaptarse a las condiciones ambientales (Caballero 2008). La mayoría de mohos y levaduras son aerobios estrictos, pueden crecer en un rango de pH que va desde 2 a 9, su rango de temperatura va de 10 a 35°C existiendo algunas especies que crecen por debajo o por encima de este rango, pueden crecer a una actividad de agua (a_w) de 0.85 o inferior (Tournas et al. 2001), el grado de deterioro que

presente en los alimentos se manifiesta por manchas de pudrición de diversos tamaños y colores, micelios blancos algodonosos, esporulaciones muy coloreadas, sabores y olores anormales (Moss 2008).

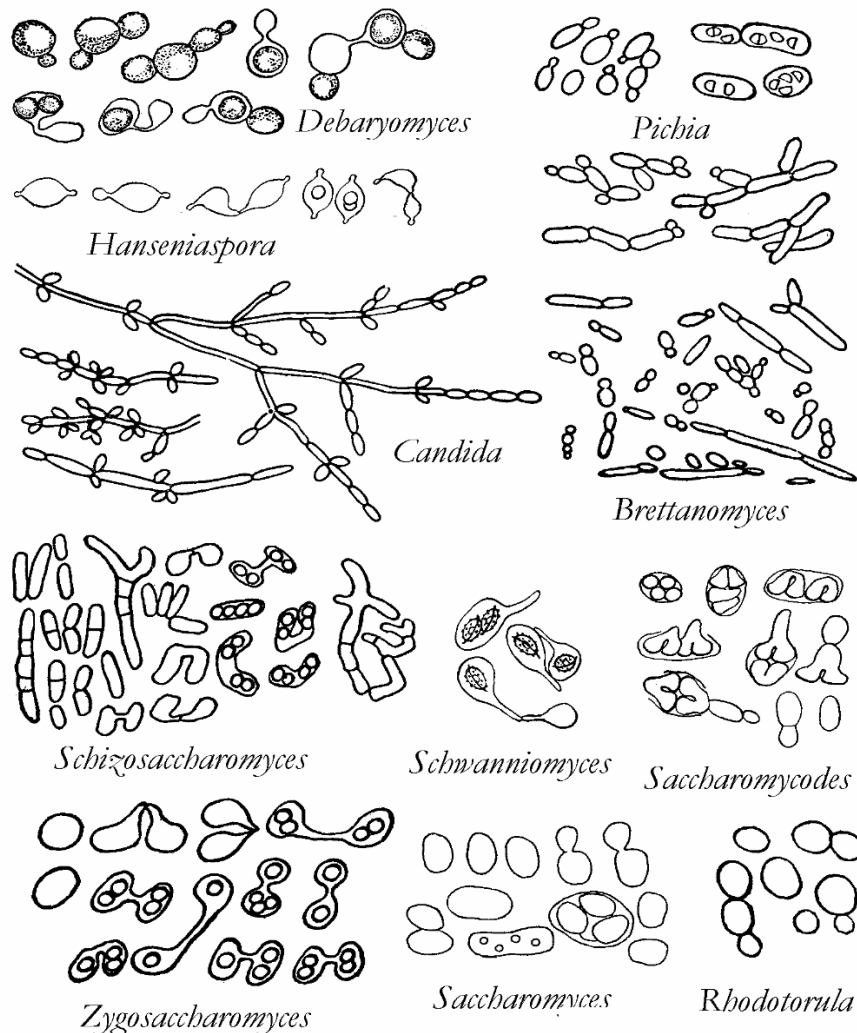
Figura 1. Estructuras típicas de mohos en alimentos



Fuente: Carrillo (2003)

Con el término levaduras nos referimos al grupo de hongos unicelulares que puede presentar o no hifas y/o pseudohifas (Mendoza 2011), estas crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas (Anderson y Calderón 1999). Generalmente muestran un aspecto pastoso, se multiplican por brotación o fisión (Carrillo 2003) y muchas especies tienen un teleomorfo ascomicético y otras basidiomicético (Deák 1992). En la Figura 2 se indica algunas de las estructuras más conocidas.

Figura 2. Estructuras de algunos géneros de levaduras



Fuente: Carrillo (2003)

2.3 MICOTOXINAS

Desde 1960, a partir de la muerte repentina de 100 000 pavos debido al consumo de harina de maní proveniente de Brasil (Soriano del Castillo 2007), se tiene conocimiento de las micotoxinas. Los estudios demuestran que estas son metabolitos fúngicos secundarios con la capacidad de producir efectos tóxicos (carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos y estrogénicos) en humanos y animales (Ozer et al. 2012). Hasta la actualidad se han llegado a conocer más de 300 especies de micotoxinas de las cuales sólo algunas se han estudiado, se conoce que las micotoxinas son producidas principalmente por 3 géneros de mohos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Lazo y Sierra 2008).

2.4 RECUESTO DE MOHOS Y LEVADURAS

“Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C” (INEN 1998).

2.5 AISLAMIENTO

“El aislamiento consiste en la separación e inmovilización de los organismos particulares sobre o dentro un medio nutritivo solidificado por agar o algún otro agente gelificante adecuado. Cada organismo viable da origen, al multiplicarse, a una colonia de la cual pueden hacerse transferencias fácilmente” (Stanier et al. 1996).

En algunos casos para lograr el aislamiento de una colonia de interés es necesario realizar diluciones previas al aislamiento final, con el objetivo de

obtener colonias separadas que permitan conseguir subcultivos puros (Anderson y Calderón 1999).

2.6 CLASIFICACIÓN

La clasificación de mohos y levaduras ayuda a definir tanto el género y la especie de la cepa fúngica previamente aislada (Anderson y Calderón 1999), para ello se procede a la identificación adecuada de diversos parámetros como:

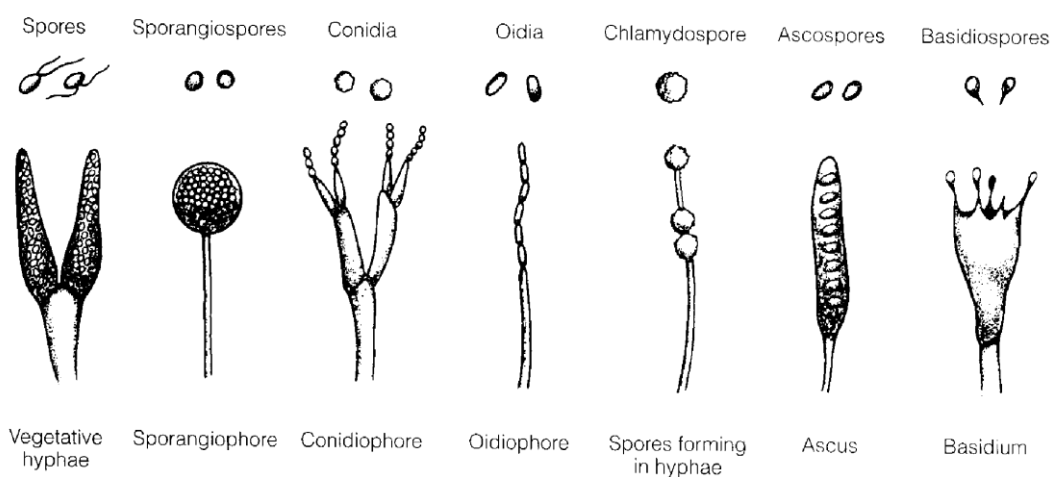
2.6.1 Macroscópicos

Se observa el grado de crecimiento y aspecto de las colonias como la forma, tamaño, textura superficial, color y olor (Sanz Cervera 1992).

2.6.2 Microscópicos

Se observa la formación de esporas, hifas, pseudohifas, conidias, micelio (Mendoza 2011). En la Figura 3 se indica algunos tipos de esporas.

Figura 3. Tipos de esporas y estructuras formadoras de esporas



Fuente: Carrillo (2003)

2.7 CRIO CONSERVACIÓN

Consiste en la elección del mejor método de conservación a fin de que las cepas micológicas sean viables con el paso del tiempo (Hofmann 1991), para este estudio se trabajó con el “Método de conservación a largo plazo” a fin de poder alcanzar los tres objetivos que se busca al conservar cepas microbianas, los cuales son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos del 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables con el transcurso del tiempo (García y Uruburu 2000).

Con el método seleccionado se podrá tener un cultivo puro, viable y estable por aproximadamente 10 años (García y Uruburu 2000; Weng Alemán et al. 2005), el fundamento del método consiste en la congelación de las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector (glicerol) y su almacenamiento a temperaturas inferiores a cero grados centígrados preferiblemente (-80°C), con la cual se disminuye la actividad de agua (aw). De esta forma, al no disponer las células de agua, se inhibe el crecimiento, garantizando así la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas (Espinel-Ingroff et al. 2004). Hay 4 factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células al momento de conservar; estos son:

2.7.1 Edad de las células

La mayoría de las veces es aconsejable trabajar con células ya maduras que han iniciado la fase estacionaria de la curva de crecimiento, solamente cuando se trata de organismos que presenten en su ciclo de vida algún estado que les

prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado (García y Uruburu 2000).

2.7.2 Velocidad en la congelación y descongelación

Las variaciones de temperatura deben ser lo más rápidas posibles, tanto para la congelación como para la descongelación, de acuerdo al estudio realizado por Juarros et al. (1993) se determinó que con una etapa de pre-enfriamiento de las colonias a 4°C por una hora, seguido por la congelación a -80°C se conservan mejor las cepas, mientras que la mejor temperatura de descongelación es a 37° C.

2.7.3 Temperatura de almacenamiento

Debe ser lo más baja posible, para conservar por mucho más tiempo es recomendable sumergirlos en nitrógeno líquido, que alcanza una temperatura de -195°C, para ello se añade un crioprotector no iónico, como glicerol para disminuir la cantidad de hielo que se forma dentro de la célula, evitando el aumento de la concentración iónica. Cuando se va a trabajar seguidamente con las cepas es recomendable conservarlas en criotubos, a fin de evitar la congelación y descongelación de todo el grupo (García y Uruburu 2000).

2.7.4 Uso de agentes crioprotectores

Estas sustancias son las encargadas de proteger del daño que se pueda producir en las células microbianas al momento de la congelación (Hofmann 1991), existen muchos compuestos que se pueden utilizar como agentes crioprotectores, pero el que se utiliza con mayor frecuencia es glicerol, por ser altamente no iónico, usualmente se lo utiliza en concentraciones del 10 al 20%. También se puede utilizar dimetil sulfóxido, leche descremada y algunos

carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa o inositol. Para la elección adecuada del agente crioprotector, se debe considerar principalmente el tipo de microorganismo que se desea conservar y las condiciones de almacenamiento (Rico et al. 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 PROPÓSITO U OBJETIVO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN:

Conocer la calidad micológica de subproductos de mango.

3.2 COMPONENTE U OBJETIVO ESPECÍFICO DE LA INVESTIGACIÓN:

Aislar y clasificar mohos y levaduras presentes en subproductos de mango.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS Y EQUIPOS

4.1.1 Reactivos

Antibiótico Itraconazol.

Azul de lactofenol.

Tween^R 80

Cristal Violeta.

Glicerina.

Formaldehido.

Agar Papa Dextrosa (PDA) de la marca comercial DifcoTM.

Caldo Saboraud de la marca comercial DifcoTM.

4.1.2 Equipos

Cámara de flujo laminar Esco clase II

Balanza Mettler Toledo

Contador de colonias Quebec

Incubadora Lab-Line

Autoclave digital Yamato

Estufa Memmert

Estufa Cole Parmer 2.

Crio congelador ULT

Microscopio Zeiss

4.2 MUESTRA

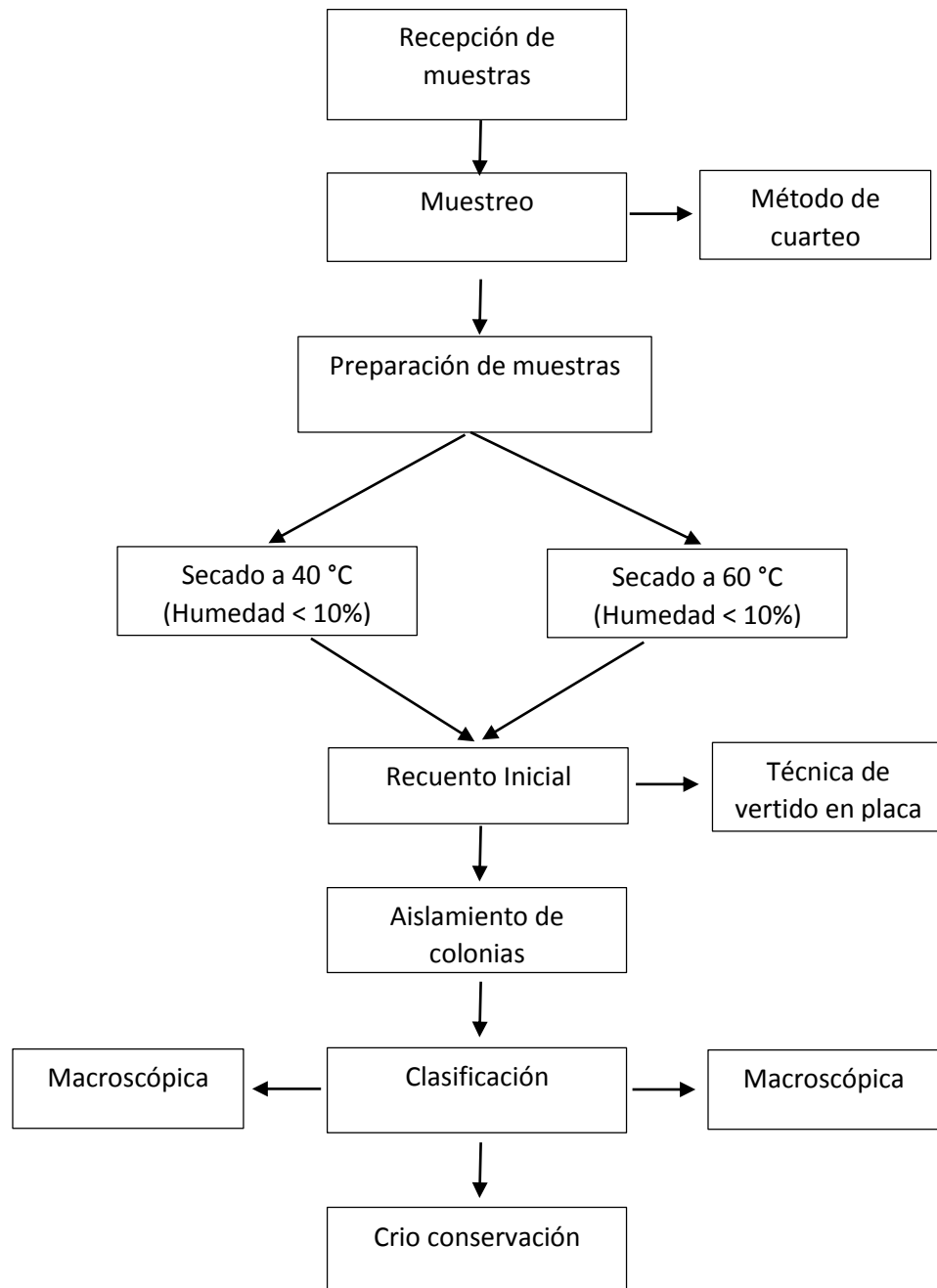
Se trabajó con muestras de subproductos (piel y pulpa adherida a la piel) de mango, generadas en la empresa “Agroficial”. Las muestras fueron puestas en congelación inmediatamente después de la generación de las mismas en la empresa, posterior a ello fueron transportadas a -20° C desde la ciudad de Guayaquil al laboratorio de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

4.2.1 MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se muestreó un total de 8 cajas de aproximadamente 22 Kg c/u; para ello se utilizó el método de cuarteo que consistió en dividir la muestra de cada caja en cuatro partes iguales con la ayuda de una sierra eléctrica, previamente esterilizada. A partir de aquí se raspó con un cuchillo todos los lados de cada una de las partes obtenidas, seguidamente se mezcló todo y se tomó una muestra representativa de 3 kg en total; la cual se dividió en 3 fundas ziploc de 1 Kg, previamente esterilizadas en luz ultravioleta.

Las muestras fueron deshidratadas a 40° y 60° C, durante el tiempo suficiente hasta obtener una humedad inferior al 10%, el resto de la muestra se congeló a -20° C. Todas las muestra se sembraron el mismo día. El proceso de preparación de la muestra se indica en la Figura 4.

Figura 4 Esquema de preparación de la muestra



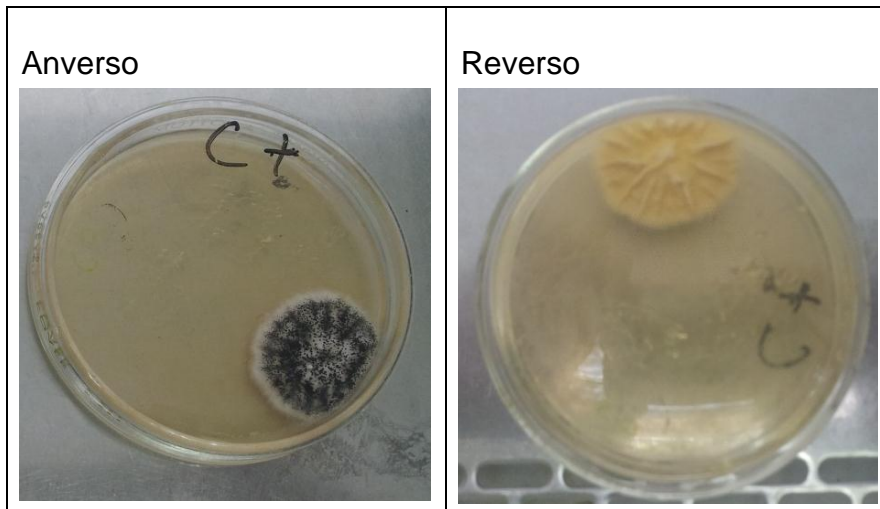
Fuente: El autor.

4.3 RECUESTO DE MOHOS Y LEVADURAS

El recuento se realizó por triplicado según la técnica de vertido en placa como lo indica la FDA BAM capítulo 18 (Tournas et al. 2001), primeramente se colocó 10 g de muestra en 90 mL de agua peptonada a fin de obtener la dilución 10^{-1} , se agitó a velocidad media en el vortex por 30 seg; a partir de esta solución se tomó 1 mL y se realizó diluciones hasta 10^{-5} . En cada caja se adicionó 50 μ L de antibiotico Itraconazol y 1 mL de cada dilución, seguidamente se colocó el agar PDA hasta cubrir todo el diámetro de la placa (aproximadamente 20 mL), se dejó gelificar y se incubó a 25° C (\pm 2) por 7 días, posteriormente se contó el número de colonias por placa en el contador de colonias, en el Anexo 1 se muestra un esquema del proceso.

Se realizó un blanco de esterilidad a fin de conocer la fiabilidad del proceso y un control positivo inoculado con la cepa pura de *Aspergillus niger* **ATCC 16404** como se indica en la Figura 5, esto se realizó con la finalidad de contrastar con la muestra y verificar la presencia o ausencia de este moho productor de micotoxinas en la misma. Los resultados que se reportaron son en unidades formadoras de colonias (UFC/g) basado en el recuento promedio del triplicado de las placas que contenían de 10 a 150 colonias (Tournas et al. 2001).

Figura 5 Cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404



Fuente: El Autor

4.4 AISLAMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

Las 5 colonias de diferente morfología macroscópica de acuerdo a su textura superficial, color y forma que presentaron en el recuento, fueron cortadas con el asa micológica y transferidas a nuevas placas con el mismo medio de agar PDA más 50 μ L de Itraconazol y se incubaron por 7 días a 25° C (Anderson y Calderón 1999). A partir de aquí se hicieron repiques con el asa micológica en nuevos medios de cultivo que se incubaron por 7 días, a la misma temperatura. Fue necesario realizar un total de 3 repiques hasta que finalmente la colonia se observó totalmente pura (un solo color, forma y textura superficial); para verificar su pureza se realizaron observaciones en el microscopio (Sanz Cervera 1992) y se constató que cada colonia muestre una sola estructura.

4.5 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

4.5.1 Clasificación macroscópica

La clasificación macroscópica se la realizó con ayuda de las claves macroscópicas propuestas por Samson et al. (2010), para ello se comparó las características como: Tamaño, forma, aspecto, color y producción de pigmento difusible.

4.5.2 Clasificación microscópica

La clasificación microscópica se llevó a cabo con ayuda de las claves taxonómicas propuestas por Carrillo (2003) y Samson et al. (2010). De acuerdo a la estructura que mostraron las colonias bajo el microscopio, se fue comparando con las propuestas en bibliografía, prestando mayor atención a lo que son conidias, hifas, esporas y micelio (Gourama y Bullerman 1995).

4.6 IDENTIFICACIÓN DE MOHOS POR LA TÉCNICA DE RIDELL

Para evaluar las cepas fúngicas en el microscopio se utilizó la técnica de Ridell, para lo cual se cortó cuadros de agar PDA de 1 cm de lado y 3 mm de espesor, luego se lo colocó sobre un portaobjetos el cual estuvo dentro de una caja petri estéril sobre dos varillas de vidrio, a fin de que no esté en contacto directo con la caja; después se inoculó por picadura en cada uno de los lados del agar, seguidamente se colocó un cubreobjetos y se presionó ligeramente para que se adhiriera al medio, se adicionó 5 mL de glicerol al 10% (V/V) en la caja petri a fin de que el moho tenga la humedad suficiente para su crecimiento, se incubó por 48 horas a 25°C. En el Anexo 2 se muestra un esquema del proceso.

Con el moho ya desarrollado se retiró el glicerol con una pipeta y se adicionó 5 ml de formaldehído durante 15 min para inactivar al mismo, luego se desprendió con cuidado el cubreobjetos y el portaobjetos y se colocó una gota de azul de lactofenol a cada uno. Se observó en el microscopio a 40X y a 100X con aceite de inmersión Tween^R 80, luego con ayuda de las claves taxonómicas propuestas en bibliografía; se procedió a su clasificación.

4.7 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Para la identificación de levaduras se lo realizó mediante tinciones, que consistió en tomar con el asa un poco de la colonia y se la coloca en un portaobjetos que contenga una gota de agua peptonada estéril, se fijó la muestra con ayuda de la lámpara de alcohol evitando quemarla, se tiñó con cristal violeta durante 3 minutos y seguidamente se lavó y se dejó escurrir. Se observó en el microscopia a 40x la presencia o ausencia de hifas, pseudohifas, cápsula, blastoconidias, artroconidias, ballistoconidias (Mendoza 2011).

4.8 CRIO CONSERVACIÓN

Se utilizó el “Método de conservación a largo plazo” el mismo que nos permitió tener un cultivo puro, viable y estable. Se realizó un total de 20 copias por colonia, en base a bibliografía se estima que estas cepas serán viables por aproximadamente 10 años (Weng Alemán et al. 2005), para lo cual se realizó lo siguiente:

4.8.1 Preparación de material

Se lavó todo el material de vidrio como pipetas, tubos y matraces; a los tubos criogénicos se los envolvió en papel aluminio y se colocó cinta de control de esterilidad, se preparó un total de 100 tubos criogénicos de 1,5 mL los cuales

fueron distribuidos en 20 tubos por colonia; también se preparó un frasco con 300 mL de agua destilada y 18 tubos de ensayo con 10 mL de agar PDA, todo esto se esterilizó en el autoclave a 121° C a 1,5 atmósferas de presión por 15 minutos.

4.8.2 Preparación de cultivos

Los tubos de agar Sabouraud se dejaron gelificar a temperatura ambiente en forma horizontal a fin de obtener “tubos de agar inclinado”, seguidamente se inoculó cada colonia con el asa micológica pasando por toda la superficie del agar en estriado hasta llegar a la parte superior del tubo (Martos et al. 1994), se prepararon 3 tubos por colonia, posteriormente se incubó a 25° C por 7 días hasta que los cultivos produjeron micelio.

4.8.3 Preparación del inóculo

La solución criogénica consistió en una mezcla de caldo Sabouraud más 10 % de glicerol (V/V), la cual en condiciones asépticas se colocó en un volumen de 10 mL a cada tubo de ensayo con el hongo propagado, se agitó en el vortex durante 15 seg, con la suspensión de esporas se llenó tubos eppendorf de 1,5 mL, posteriormente se los colocó a 4°C por 1 hora, seguido por la congelación a -80°C (Juarros et al.1993).

4.9 CONTROL DE VIABILIDAD

Para verificar la viabilidad de las cepas aisladas, se realizó un control mediante el recuento de colonias por gramo (UFC/g) a los 0, 30 y 60 días (Pasarell y McGinnis 1992), el porcentaje de viabilidad se calculó tal como lo muestra la Ec. (1).

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{X_f}{X_0} \times 100 \text{ Ec. (1)}$$

Dónde:

X_f = corresponde al número total de UFC/g después del tiempo transcurrido en almacenamiento.

X_0 = corresponde al número total de UFC/g en el momento inicial.

En el Anexo 4 se puede observar el número de UFC/g correspondientes a cada colonia y su respectivo porcentaje de viabilidad. También se elaboró una ficha técnica para cada especie fúngica, las mismas que se pueden observar en los Anexos del 5 al 9.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RECUENTO INICIAL

En la Tabla 1 se indica los resultados obtenidos en el recuento inicial de mohos y levaduras, tanto en fresco como deshidratado a 40 y 60° C. La muestra deshidratada a 40°C muestra un aumento significativo de 51000 a 67000 UFC/g respecto a la muestra fresca, este aumento se debe a que se potencia el desarrollo de las levaduras en rangos de temperatura de 25 a 37° C (Uribe 2007) y de acuerdo a Carrillo (2003), las levaduras pueden crecer en rangos de temperaturas entre 24 y 48°C. La muestra deshidratada a 60°C presentó el mismo número de UFC/g que la muestra fresca, pese a que a temperaturas mayores a los 50°C se inhibe el crecimiento de mohos y levaduras (Carrillo 2003), no obstante pueden seguir latentes y al momento de colocar la muestra en agua peptonada para su posterior siembra, se favoreció su reactivación por el aumento de la aw, ya que “la mayoría de levaduras que causan deterioro en los alimentos crecen a una actividad de agua mínima de 0.90-0.95” (Carrillo 2003).

Los recuentos con las respectivas diluciones se encuentran especificados en el Anexo 3.

Tabla 1 Resultados del recuento inicial

Muestra	UFC/g
Subproducto fresco	51000
Subproducto deshidratado a 40° C	67000
Subproducto deshidratado a 60° C	51000

Fuente: El Autor

5.2 COLONIAS AISLADAS

En la Tabla 2 se indica las 5 especies fúngicas que se encontraron en los diferentes tratamientos. Se observa que *Oidiodendron griseum* robak estuvo presente en los 3 tratamientos, esto es debido a que es una especie fúngica micromicetes propia del suelo y que posee una gran adaptabilidad a diversas condiciones de temperatura pudiendo sobrevivir incluso a las bajas temperaturas de la Antártida Argentina (Comerio y Mac Cormack 2004), mientras que *Cándida krusei* y *Pichia fermentans* son las principales especies presentes en la fruta de mango y que se han encontrado aún en chips de mango (Warnasuriya et al. 1985).

Tabla 2 Incidencia de especies fúngicas en los distintos tratamientos

Especie fúngica	Tratamiento de la muestra		
	En fresco	Deshidratada 40° C	Deshidratada 60° C
<i>Candida krusei</i>	x	x	
<i>Oidiodendron griseum</i> robak	x	x	X
<i>Cryptococcus laurentii</i>	x	x	
<i>Geotrichum Candidum</i> Link	x		
<i>Pichia fermentans</i>		x	X

Fuente: El Autor

5.3 IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS


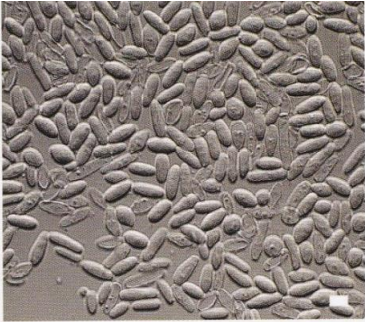
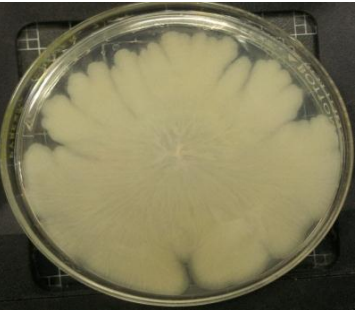
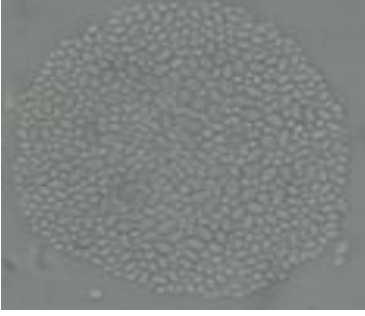
Cada colonia fue clasificada según su género, para la especie se realizó una estimación basada en la comparación de las características macro y microscópicas propuestas por Samson et al. (2010) y las fotografías macro y microscópicas obtenidas en este estudio. No se puede dar una clasificación

exacta de la especie, debido a que se requiere de técnicas de Biología Molecular como PCR (Mendoza 2011).

5.3.1 *Candida Krusei*

La primera colonia fue identificada como *Cándida Krusei*, en la Figura 6 se puede observar las características macroscópicas como el respectivo color cremoso y su contorno en forma de flor, microscópicamente se puede observar células levaduriformes que presentan blastoconidias y clamidiosporas típicas de *Cándida Krusei* (Samson et al. 2010).

Figura 6 Características macroscópicas y microscópicas de *Candida krusei*

<p>A</p>  <p>B</p>		<p style="text-align: center;">Clasificación científica</p> <p>Reino Fungi</p> <p>Filo Ascomycota</p> <p>Clase Saccharomycetes</p> <p>Orden Saccharomycetales</p> <p>Familia Saccharomycetaceae</p> <p>Género <i>Candida</i></p> <p>Especies <i>krusei</i></p>
<p>B</p> 		
<p>A: <i>Candida krusei</i> a los 7 días a 25° C en MEA (Samson et al. 2010)</p> <p>B: <i>Candida krusei</i> a los 7 días a 25° C en PDA (Autor)</p> <p>Fuente: El Autor</p>		

Cándida Krusei estuvo presente en la muestra fresca y deshidratada a 40° C, estos resultados concuerdan con los expuestos por Warnasuriya et al. (1985) el cual señala que *Cándida Krusei* es la levadura más predominante en frutas frescas entre ellas el mango. Se considera que la predominancia de esta levadura se debe a que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Mendoza 2011).

Se ha demostrado que *Cándida Krusei* es una de las levaduras causantes de la fermentación de frutos (Suresh et al. 1982) e incluso la degradación de alimentos ácido-líquidos (Deak y Beuchat 1993), por ello se considera que usar subproductos de mango contaminados por *Cándida Krusei* en matrices alimentarias, puede causar el pronto deterioro del producto final. Por ejemplo, en yogures aunque las levaduras no están involucradas en la fermentación para la producción de yogurt, son la causa del deterioro cuando la población de levaduras alcanza de 10⁵ a 10⁶ Células/g (Fleet 1990). Por otro lado en un estudio de la calidad microbiológica de chips de mango, los resultados mostraron que *Cándida Krusei* es causante del deterioro de este producto durante su almacenamiento (Courtois et al. 2009).

El género *Cándida Krusei* puede afectar al ser humano ocasionando candidiasis que usualmente es una infección de la piel o membranas mucosas, genera enrojecimiento, picazón y malestar incluso en la cavidad oral (Dixon et al. 1996). *Cándida Krusei* también puede afectar a los animales, por ejemplo en el ganado vacuno puede causar mastitis no solo después del tratamiento antibiótico intramamaria, sino también en condiciones de contaminación del medio ambiente (Elad et al. 1995).


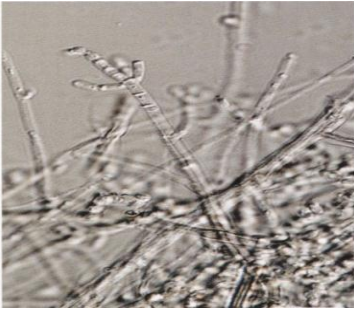
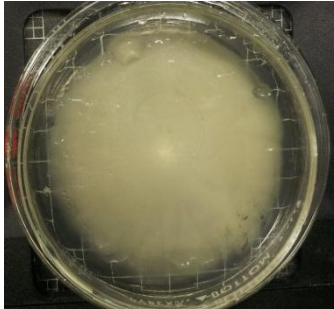

En la Tabla 2 se observa que en la muestra deshidratada a 60° C se inhibió el crecimiento de *Candida Krusei*, por tanto si los subproductos de mango son sometidos a un proceso de pasteurización igual o superior a los 60°C por al

menos 6 min, se puede inhibir el crecimiento de *Cándida Krusei* y así lograr prolongar la vida útil del producto final.

5.3.2 *Oidiodendron griseum robak*

La segunda colonia fue identificada como *Oidiodendron griseum robak*, en la Figura 7 se puede observar las características macroscópicas como su color cremoso y su contorno totalmente redondo, produce exudado en la placa, y a los 7 días ocupa toda la superficie del agar. Microscópicamente se puede observar que presenta aspectos en común como la presencia de conidióforos erectos y arthroconidias propias de *Oidiodendron griseum robak* (Samson et al. 2010).

Figura 7 Características macroscópicas y microscópicas de *Oidiodendron griseum robak*

<p>A</p>  <p>B</p>		<p style="text-align: center;">Clasificación científica</p> <p>Reino: Hongos</p> <p>Clase Dothideomycetes</p> <p>Dirección <i>incertae Sedis</i></p> <p>Familia Myxotrichaceae</p> <p>Género <i>Oidiodendron</i></p> <p>Especies <i>Griseum</i></p>
		

A: *Oidiodendron griseum robak* a los 7 días a 25° C en OA (Samson et al. 2010)

B: *Oidiodendron griseum robak* a los 7 días a 25° C en PDA (Autor)

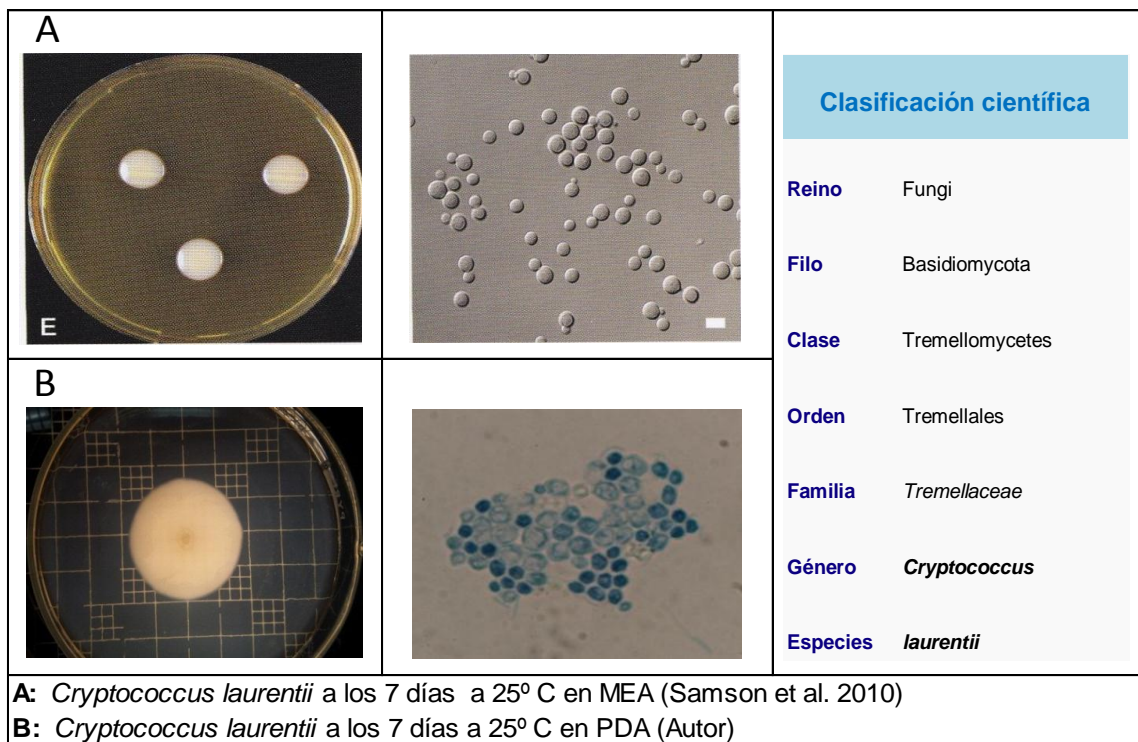
Fuente: El Autor

Estudios han reportado que *Oidiodendron griseum* robak es una especie fúngica propia del suelo (micromicetes) involucrada en el deterioro de los alimentos almacenados aún a temperaturas bajo 0° C (Comerio y Mac Cormack 2004), también ha sido aislada de las raíces de muchas Ericaceae (Brisson et al. 1974) tiene la facultad de adaptarse a diferentes tipos de suelos y plantas, y su hábitat está ampliamente distribuido geográficamente debido a que es Micorriza Ericoides (Domsch et al. 1980).

5.3.3 *Cryptococcus laurentii*.

La tercera colonia fue identificada como *Cryptococcus laurentii*, en la Figura 8 se puede observar las características macroscópicas como el respectivo color cremoso y forma totalmente redonda de la colonia; microscópicamente presenta células levaduriformes esféricas y blastoconidias típicas de *Cryptococcus laurentii* (Samson et al. 2010).

Figura 8 Características macroscópicas y microscópicas de *Cryptococcus laurentii*



Fuente: El Autor




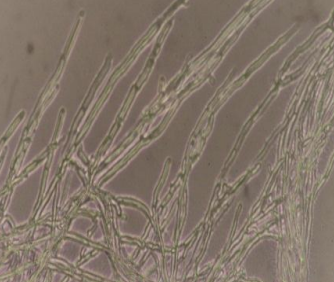
Cryptococcus laurentii es una especie fúngica aislada de la superficie de diferentes frutas (Lima et al. 1998), esta especie se considera como un hongo antagonista ya que inhibe la acción fitopatogena de varios de los principales patógenos postcosecha como *Penicillium expansum* o “moho azul” (Zhang et al. 2005), por tanto es posible que la presencia de *Cryptococcus laurentii* en los subproductos de mango haya inhibido el crecimiento de *Penicillium expansum*, y por esta razón no se o encontró en el subproducto.

En un estudio realizado por Zhang et al. (2007) se evaluó la actividad antagonista de *Cryptococcus laurentii* en la superficie de duraznos, demostrándose que se reduce significativamente la descomposición natural y la causada por el moho azul, sin afectar los parámetros de calidad de la fruta después del almacenamiento a 2 ° C durante 30 días, seguido de 20 ° C durante 7 días.

5.3.4 *Geotrichum Candidum* Link

La cuarta colonia fue identificada como *Geotrichum Candidum* Link, en la Figura 9 se puede observar las características macroscópicas como su aspecto algodonado de color blanco; microscópicamente presenta hifas ramificadas tipo aéreas, en algunos de los extremos muestra ruptura de hifas fértiles que son características típicas de *Geotrichum Candidum* Link (Samson et al. 2010).

Figura 9 Características macroscópicas y microscópicas de *Geotrichum Candidum* Link

<p>A</p>  <p>B</p>		<p style="text-align: center;">Clasificación científica</p> <p>Reino Fungi</p> <p>Filo Ascomycota</p> <p>Clase Saccharomycetes</p> <p>Orden Saccharomycetales</p> <p>Familia Endomycetaceae</p> <p>Género <i>Geotrichum</i></p> <p>Especies <i>Candidum</i></p>
<p>B</p>  		
<p>A: <i>Geotrichum Candidum</i> Link a los 7 días a 25° C en OA (Samson et al. 2010)</p> <p>B: <i>Geotrichum Candidum</i> Link a los 7 días a 25° C en PDA (Autor)</p>		

Fuente: El Autor

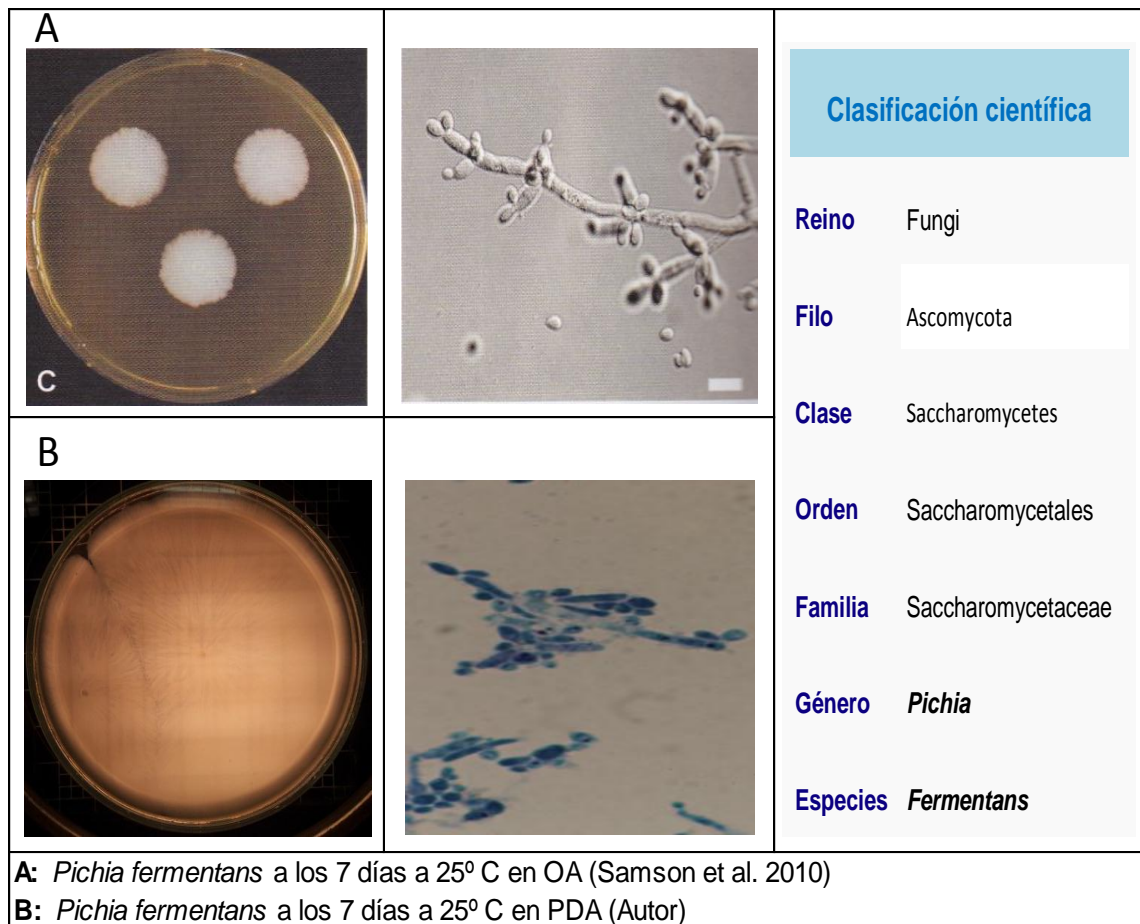
Geotrichum Candidum Link es una especie fúngica que presenta una gran variedad de genotipos y fenotipos, por ello es que no se facilita su clasificación como levadura o como hongo tipo levadura (Boutrou y Guéguen 2005), es uno de los principales patógenos postcosecha de los cítricos como naranjas, limones, mandarinas y pomelos) (Spencer et al. 1992; Plaza et al. 2003).

Geotrichum Candidum Link también presenta aspectos positivos los cuales son beneficiosos para la industria alimentaria. Por ejemplo la industria láctea muestra interés en *Geotrichum Candidum* Link debido a que esta especie posee diferentes rutas metabólicas que pueden ayudar en la maduración de quesos blandos y semiduros y a la vez hacer una contribución positiva al desarrollo del sabor y aroma (Boutrou y Guéguen 2005).

5.3.5 *Pichia fermentans*

La quinta colonia fue identificada como *Pichia fermentans*, en la Figura 10 se puede observar que macroscópicamente este género es de color blanco aterciopelado, a los 7 días ocupa el mayor espacio disponible, por el reverso es de color semi amarillento con un centro no bien definido. Microscópicamente presenta hifas y blastoconidias típicas de *Pichia fermentans* (Samson et al. 2010).

Figura 10 Características macroscópicas y microscópicas de *Pichia fermentans*



Pichia fermentans es una especie generalmente aislada de manchas en descomposición de los cítricos como naranjas, limones, mandarinas y pomelos (Spencer et al. 1992), también ha sido aislada de alimentos mínimamente procesados siendo uno de los géneros más frecuentes en lechugas (*Magnuson et al. 1990*). A *Pichia fermentans* se considera como una de las especies responsables de la fermentación de azúcares de los alimentos, por tanto puede causar el deterioro de la matriz alimentaria que contenga estos subproductos de mango.

Por otro lado *Pichia fermentans* presenta propiedades tecnológicas de interés para la industria de los chocolates, debido a que estudios han demostrado que las especies *Saccharomyces rosei* y *Pichia fermentans* son las responsables de la fermentación de azúcares de la pulpa de cacao (Martelli y Dittmar 1961). la industria de las bebidas alcohólicas también presenta interés en *Pichia fermentans* por su capacidad de mejorar aromas y aumentar la presencia de alcoholes superiores y acetato de etilo tanto en el mosto de uva y jugo de naranja (Mingorance-Cazorla et al. 2003).

5.4 CONTROL DE VIABILIDAD

Se crioconservaron 5 cepas fúngicas aisladas de los subproductos de mango. Cada uno de los cultivos mantuvo sus características morfológicas macro y microscópicas y no se observó contaminación por otros microorganismos (Rico et al. 2004), lográndose alcanzar el propósito del método usado.

Tabla 3 Porcentajes de viabilidad

Especie fúngica	Tiempo de conservación			
	0 días	30 días	60 días	90 días
	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Candida krusei</i>	100	96	84	84
<i>Oidiodendron griseum</i>	100	94	88	88
robak				
<i>Cryptococcus laurentii</i>	100	94	88	88
<i>Geotrichum Candidum</i>	100	90	80	80
Link				
<i>Pichia fermentans</i>	100	96	85	85

Fuente: El Autor

En la Tabla 3 se muestra los porcentajes de viabilidad de las cepas durante los primeros 3 meses de crioconservación, se realizó este estudio a fin de conocer la eficacia del método aplicado (Huertas et al. 2006). Se puede observar una disminución significativa de los porcentajes de viabilidad al término del primer y segundo mes, se considera que se debe a que no cesaron las funciones de crecimiento y metabolismo de las cepas, en cuanto a esto Croan et al. (1999) hace notar la necesidad de almacenar microorganismos a una temperatura mínima de -150°C la cual puede lograrse con el uso de nitrógeno líquido; asegurándose así un cese del metabolismo celular, y por tanto el mantenimiento de la viabilidad de las cepas.

Al término del tercer mes se puede observar que todas las cepas logran alcanzar estabilidad respecto al segundo mes de crio conservación, esto debido a que cesó completamente el metabolismo celular (Croan et al. 1999) y también se atribuye esto a la acción del glicerol el cual como agente protector no iónico se encarga de disminuir la cantidad de hielo presente en las células impidiendo la muerte celular (García y Uruburu 2000).

6. CONCLUSIONES

Las especies fúngicas que se encontraron en los subproductos de mango fueron, *Cándida krusei*; *Oidiodendron griseum robak*; *Cryptococcus laurentii*; *Geotrichum Candidum Link*; *Pichia fermentans*, ninguna de estas especies son productoras de micotoxinas.

Tanto *Geotrichum Candidum Link* y *Pichia fermentans* presenta propiedades de interés tecnológico para la producción de alimentos.

El “método de conservación a largo plazo”, con el uso de glicerol como agente crioprotector es adecuado para la crio conservación de *Candida krusei*, *Oidiodendron griseum robak*, *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum Candidum Link*, *Pichia fermentans*, ya que se logra alcanzar los propósitos del método al mantener cultivos libres de contaminación por microorganismos y por ácaros, así como también un porcentaje de viabilidad superior al 70 para las 5 cepas fúngicas.

7. RECOMENDACIONES

Es preciso realizar un proceso de pasteurización a los subproductos de mango para inhibir el crecimiento de levaduras ya que podrían causar el acortamiento de la vida útil del producto final, el proceso de pasteurización debe ser de al menos 60°C por 6 min a fin de no degradar compuestos bioactivos de interés.

Es necesario llevar a cabo técnicas de biología molecular como PCR para obtener plena certeza de que la clasificación por especie de las colonias es totalmente correcta.

Procurar que el crio congelador sea abierto la menor cantidad de veces posibles, a fin de que la temperatura interna permanezca constante, ya que cambios de temperatura pueden dañar las células.

Realizar un control de viabilidad de las cepas aisladas cada año a fin de verificar el porcentaje de supervivencia, pureza y estabilidad.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M; Calderón, V. 1999. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Segunda ed. Madrid: Ediciones Diaz de Santos.p.
- Ayala-Zavala, JF; Vega-Vega, V; Rosas-Domínguez, C; Palafox-Carlos, H; Villa-Rodriguez, JA; Wasim Siddiqui, M; Dávila-Aviña, JE; González-Aguilar, GA. 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* 44(7): 1866–1874.
- Bally, IS. 2006. *Mangifera indica* (mango) Hawai. Consultado 2013 -02-22 Disponible en: <http://www.vegetableipmasia.org/docs/Mamgo/Mangifera-mango.pdf>.
- Beuchat, LR; Cousin, MA. 2001. Yeasts and Molds. In *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*: American Public Health Association.
- Boutrou, R; Guéguen, M. 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology* 102(1): 1-20.
- Brisson, JD; Pauze, JF; Lavoie, V. 1974. Aspects mycologiques et histopathologiques du dépérissement des tiges de *Vaccinium angustifolium* Aiton. Université Laval. Faculte D" Agriculture.p.
- Bullerman, LB; Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119(1–2): 140-146.
- Caballero, A. 2008. Temas de higiene de los alimentos. In *La Habana: Editorial Ciencia Médicas*, (pp. 382).
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina: 91-98.
- Comerio, RM; Mac Cormack, W. 2004. Algunos micromicetes del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. *Rev Iberoam Micol* 21: 128-134.
- Courtois, B; Souza, C; Leveau, J; Pheulpin, P; Ekouna, J; Améyapoh, Y; Courtois, J. 2009. Hygienic quality and pectin polysaccharide characteristics of dried mango pulp chips of a togolese variety of mango, *Mangifera indica* L. *Global Journal of Pure and Applied Sciences* 15(3-4).

- Croan, SC; Burdsall Jr, HH; Rentmeester, RM. 1999. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia*: 908-916.
- Deák, T. 1992. Experiences with, and further improvement to, the Deák and Beuchat simplified identification scheme for food-borne yeasts. *DEVELOPMENTS IN FOOD SCIENCE* 31: 47-47.
- Deak, T; Beuchat, L. 1993. Yeasts associated with fruit juice concentrates. *Journal of food protection* 56.
- Dixon, DM; McNeil, MM; Cohen, ML; Gellin, BG; La Montagne, JR. 1996. Fungal infections: a growing threat. *Public health reports* 111(3): 226.
- Domsch, KH; Gams, W; Anderson, T-H. 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol. 1: Academic Press (London) Ltd.p.
- Doolotkeldieva, TD. 2010. Microbiological Control of Flour-Manufacture: Dissemination of Mycotoxins Producing Fungi in Cereal Products. *Microbiology Insights* 3(1923-MBI-Microbiological-Control-of-Flour-Manufacture:-Dissemination-of-Mycotox.pdf).
- Drusch, S; Ragab, W. 2003. Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits. *Journal of food protection* 66(8): 1514-1527.
- Elad, D; Shpigel, N; Winkler, M; Klinger, I; Fuchs, V; Saran, A; Faingold, D. 1995. Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207(5): 620.
- Elleuch, M; Bedigian, D; Roiseux, O; Besbes, S; Blecker, C; Attia, H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124(2): 411-421.
- Espinel-Ingroff, A; Montero, D; Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-Term Preservation of Fungal Isolates in Commercially Prepared Cryogenic Microbank Vials. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 1257-1259.
- Fao. 2011. Food and Agricultural Organization. Produccion de mango en el año 2009 Consultado 2012-11-22.In): Disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Fleet, GH. 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 68(3): 199-211.

- Fugelsang, K. 1997. Yeasts and Molds. In *Wine Microbiology*, (pp. 68-116): Springer US.
- Fung, F; Clark, RF. 2004. Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Clinical Toxicology* 42(2): 217-234.
- García, M; Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. In *Actualidad SEM*, vol. 30 (pp. 12-16).
- Gourama, H; Bullerman, LB. 1995. Detection of Molds in Foods and Feeds: Potential Rapid and Selective Methods. *Journal of food protection* 58(12): 1389-1394.
- Griesbach, J. 2003 Simons, AMNaT (Ed.), *Mango growing in Kenya*. Nairobi, Kenya: World Agroforestry Centre.
- Hofmann, P. 1991. Cryopreservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7(1): 92-94.
- Huertas, SLP; Casas, MMP; Morales, MB; Moreno, ZS; Castaño, DM. 2006. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova*(005): 39-49.
- Inen. 1998. Instituto ecuatoriano de normalización. Control microbiológico de los alimentos. mohos y levaduras viables. recuento en placa por siembra en profundidad. In *Norma 529*, (pp. 11). Quito- Ecuador.
- Juarros, E; Tortajada, C; García, M; Uruburu, F. 1993. Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80 degrees C: effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología (Madrid, Spain)* 9(1): 28.
- Kansci, G; Koubala, BB; Lape, IM. 2003. Effect of ripening on the composition and the suitability for jam processing of different varieties of mango (*Mangifera indica*).
- Koubala, BB; Kansci, G; Mbome, LI; Crépeau, MJ; Thibault, JF; Ralet, MC. 2008. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from "Améliorée" and "Mango" mango peels. *Food Hydrocolloids* 22(7): 1345-1351.
- Lásztity, R; El Shafei, MA; Samei, MBA; Hatour, FS; Labib, M. 1988. Biochemical studies of some non conventional sources of protein. Part 4. The proteins of mango waste stone kernels. *Food / Nahrung* 32(9): 867-873.

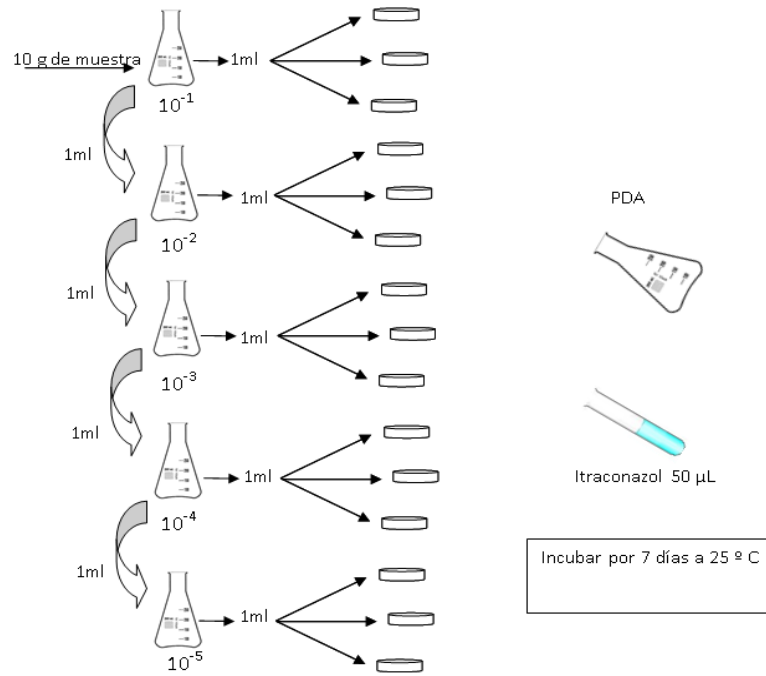
- Lazo, RF; Sierra, G. 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología* 25(1): 7-11.
- Lima, G; De Curtis, F; Castoria, R; De Cicco, V. 1998. Activity of the Yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* Against Post-harvest Rots on Different Fruits. *Biocontrol Science and Technology* 8(2): 257-267.
- Lizada, C. 1993. Mango. In Seymour, G; Taylor, J & Tucker, G (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening*, (pp. 255-271): Springer Netherlands.
- Magnuson, J; King, A; Török, T. 1990. Microflora of partially processed lettuce. *Applied and environmental microbiology* 56(12): 3851-3854.
- Marasas, WFO; Ploetz, RC; Wingfield, MJ; Wingfield, BD; Steenkamp, ET. 2006. Mango Malformation Disease and the Associated *Fusarium* Species. *Phytopathology* 96(6): 667-672.
- Martelli, H; Dittmar, H. 1961. Cacao Fermentation V. Yeasts Isolated from Cacao Beans during the Curing Process. *Applied Microbiology* 9(5): 370-371.
- Martínez, R; Torres, P; Meneses, MA; Figueroa, JG; Pérez-Álvarez, JA; Viuda-Martos, M. 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry* 135(3): 1520-1526.
- Martos, PG; Salido, FP; del Barrio, MTF. 1994. *Microbiología clínica práctica*. Servicio Publicaciones UCA.p.
- Mendoza, M. 2011. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25(1): 15-23.
- Mingorance-Cazorla, L; Clemente-Jiménez, JM; Martínez-Rodríguez, S; Las Heras-Vázquez, FJ; Rodríguez-Vico, F. 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(3): 297-304.
- Moss, M. 2008. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 104(5): 1239-1243.
- Onu. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2009. *Glosario sobre el cambio climático y bioenergía*. In). Roma:

- Ozer, H; Oktay Basegmez, Hi; Ozay, G. 2012. Mycotoxin risks and toxigenic fungi in date, prune and dried apricot among Mediterranean crops.p.
- Pasarell, L; McGinnis, MR. 1992. Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C. *Journal of Clinical Microbiology* 30(4): 1000-1004.
- Plaza, P; Usall, J; Teixidó, N; Viñas, I. 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology* 94(4): 549-554.
- Ribeiro, SMR; Barbosa, LCA; Queiroz, JH; Knödler, M; Schieber, A. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* 110(3): 620-626.
- Rico, M; Piattoni, C; Gonzalez, C; Mortela, R; Laíorre, M; Lurá, M. 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *genética* 1: 2.
- Ridell, R. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 42(2): 265-270.
- Romero, SM; Comerio, RM; Larumbe, G; Ritieni, A; Vaamonde, G; Fernández Pinto, V. 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 104(1): 43-49.
- Samson, RA; Jos, H; Thrane, U; Frisvad, JC; Andersen, B. 2010. Key to the common food- and airborne anamorphic genera. In *Food and Indoor Fungi*, vol. 2 (pp. 91). Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Sanz Cervera, S. 1992. *Prácticas de microbiología: Departamento de Agricultura y Alimentación.p.*
- Soriano del Castillo, JM. 2007. ¿Que son las micotoxinas? In *Micotoxinas en alimentos*, (pp. 393): Ediciones Díaz de Santos.
- Spencer, DM; Spencer, JFT; De Figueroa, L; Heluane, H. 1992. Yeasts associated with rotting citrus fruits in Tucumán, Argentina. *Mycological Research* 96(10): 891-892.
- Stanier, RY; Ingraham, JL; Wheelis, ML; Painter, PR. 1996. *Microbiología*. In *Métodos de la microbiología* Prentice-Hall, Inc. ed.). Barcelona: Editorial Reverté.

- Suresh, ER; Onkarayya, H; Ethiraj, S. 1982. A note on the yeast flora associated with fermentation of mango. *Journal of Applied Microbiology* 52(1): 1-4.
- Tournas, V; Stack, ME; Mislivec, PB; A., H; Bandler, KaR. 2001. *Bacteriological Analytical Manual Chapter 18 Yeasts, Molds and Mycotoxins* Consultado 2012-11-22. In): Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm>
- Ureña Bogantes, AL; González Rojas, JM; Meneses Contreras, R; Alvarado Barrantes, E. 2007. *Agrocadena del Mango*. In). Alajuela-Grecia Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Uribe , LA. 2007. *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora*. Tesis. Bogota, Pontificia Universidad Javeriana. 154 p.
- Warnasuriya, D; Liyanage, A; Weerawansa, G; Athauda, P; Jayatissa, P. 1985. Isolation and characterization of yeasts of some fruits and fruit products of Srilanka. *J National Sci Council* 13: 71-75.
- Weng Alemán, Z; EstP.er Díaz Rosa, O; Álvarez Molina, I. 2005. Conservación de microorganismos:¿ qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 43(3): 0-0.
- Zhang, H-y; Zheng, X-d; Xi, Y-f. 2005. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *BioControl* 50(2): 331-342.

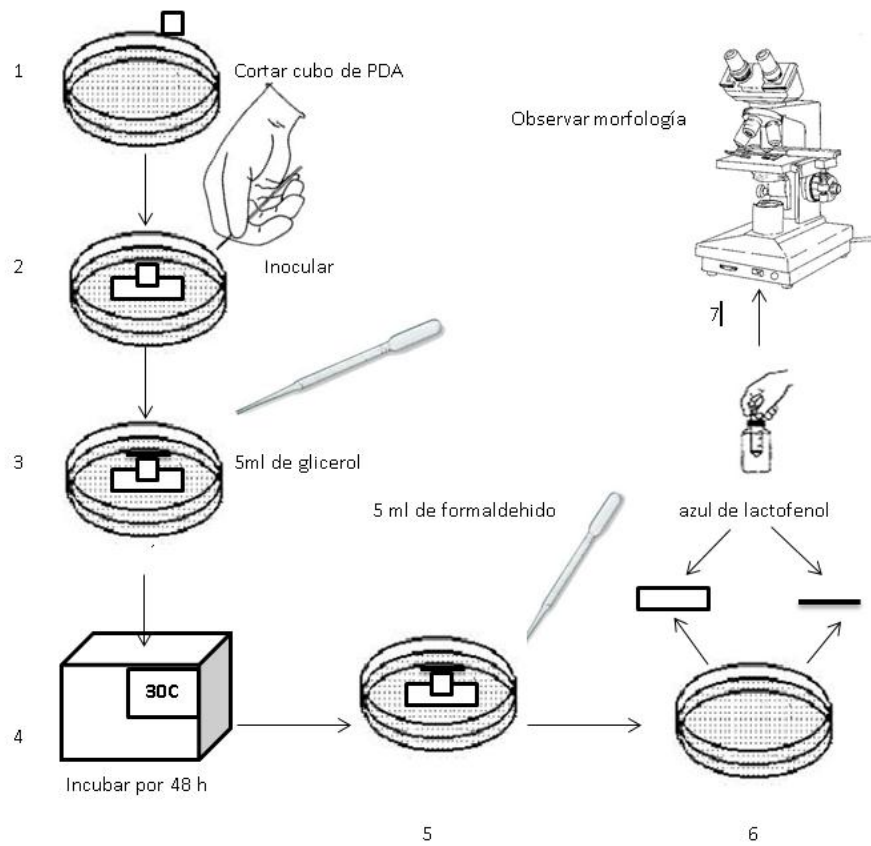
9. ANEXOS

Anexo 1 Esquema de técnica de vertido en placa



Fuente: El Autor

Anexo 2 Técnica de Ridell



Fuente: Ridell (1950)
Elaboración: El autor

Anexo 3 Recuento inicial de mohos y levaduras

Muestra	Dilución	UFC/g
Subproducto fresco	10 (-1)	Incontables
	10(-2)	Incontables
	10(-3)	51000
	10(-4)	< 10
	10(-5)	< 10
Subproducto deshidratado a 40° C	10 (-1)	Incontables
	10(-2)	Incontables
	10(-3)	Incontables
	10(-4)	670000
	10(-5)	< 10
Subproducto deshidratado a 60° C	10 (-1)	Incontables
	10(-2)	147000
	10(-3)	51000
	10(-4)	< 10
	10(-5)	< 10

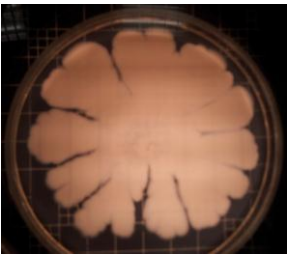

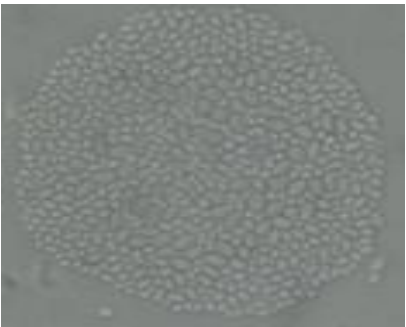
Fuente: El Autor

Anexo 4 Crio conservación de cepas fúngicas

Especie fúngica	Tiempo de crio conservación							
	0 días		30 días		60 días		90 días	
	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%	UFC/g	%
<i>Candida krusei</i>	24000	100	23000	96	20000	96	20000	96
<i>Oidiodendron griseum</i> robak	32000	100	30000	94	28000	94	27000	94
<i>Cryptococcus laurentii</i>	16000	100	15000	94	14000	94	14000	94
<i>Geotrichum Candidum</i> Link	20000	100	18000	90	16000	90	16000	90
<i>Pichia fermentans</i>	26000	100	25000	96	22000	96	22000	96

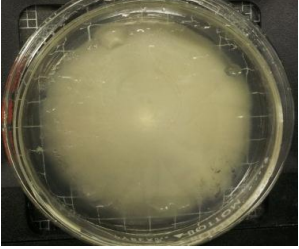


Fuente: El Autor

Anexo 5 Ficha técnica de *Candida Krusei*

FICHA TÉCNICA DE MOHOS Y LEVADURAS	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	
Responsable: Diana Hualpa	
Microorganismo: <i>Candida krusei</i>	Código de almacenamiento: CASM001
Procedencia del m o: Sub productos de mango.	Fecha de aislamiento: 4 Febrero 2013
Nivel de seguridad: 2*	Medio de conservación: Caldo Saboraud; Glicerol 10% v/v Agua destilada estéril; Temperatura: -80° C
Almacenamiento: Tubos Eppendorf de 1.5 ml a - 80° C	En el cepario desde: Febrero del 2013
Condiciones de crecimiento: Medio de cultivo: Agar PDA o Sabouraud	Características Morfológicas
	Anverso 
Características Macroscópicas: colonia de color cremoso, en la parte exterior presenta forma de flor, la parte central muestra forma de ramificación de crecimiento.	Reverso 
Características microscópicas: células levaduriformes, presenta blastoconidias, pseudohifas, clamidiosporas	Fotomicrografía 
Medidas de protección y manipulación:	Personal: Usar el equipo de protección usual (mandil, guantes, cofia, mascarilla) Desechos: Destruir el m-o en autoclave y desechar apropiadamente. Higiene personal: Lavado de manos y desinfección.
* El personal debe tener entrenamiento en el manejo de agentes patógenos; restringir el acceso al laboratorio; tener cuidado con salpicaduras y aerosoles	

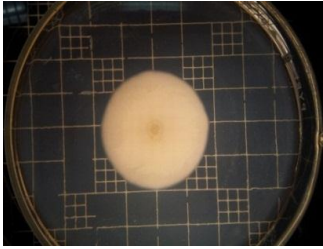
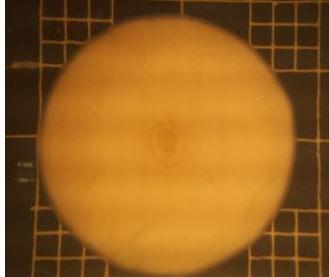
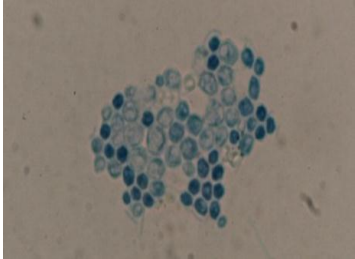
Fuente: El Autor

Anexo 6 Ficha técnica de *Oidiodendron griseum robak*

FICHA TÉCNICA DE MOHOS Y LEVADURAS	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	
Responsable: Diana Hualpa	
Microorganismo: <i>Oidiodendron griseum robak</i>	Código de almacenamiento: CASM001
Procedencia del m o: Sub productos de mango.	Fecha de aislamiento: 4 Febrero 2013
Nivel de seguridad: 2*	Medio de conservación: Caldo Saboraud; Glicerol 10% v/v Agua destilada estéril; Temperatura: -80° C
Almacenamiento: Tubos Eppendorf de 1.5 ml a - 80° C	En el cepario desde: Febrero del 2013
Condiciones de crecimiento:	Características Morfológicas
Medio de cultivo: Agar PDA o Sabouraud	Anverso 
Características Macroscópicas: colonia de color cremoso , su forma es completamente redonda, produce exudado en la placa, a los 7 días su crecimiento cubre toda la superficie del agar	Reverso 
Características microscópicas: presenta conidióforos erectos y arthroconidias	Fotomicrografía 
Medidas de protección y manipulación:	Personal: Usar el equipo de protección usual (mandil, guantes, cofia, mascarilla) Desechos: Destruir el m-o en autoclave y desechar apropiadamente. Higiene personal: Lavado de manos y desinfección.
* El personal debe tener entrenamiento en el manejo de agentes patógenos; restringir el acceso al laboratorio; tener cuidado con salpicaduras y aerosoles	


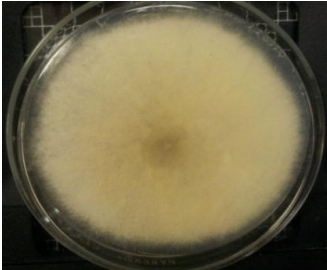
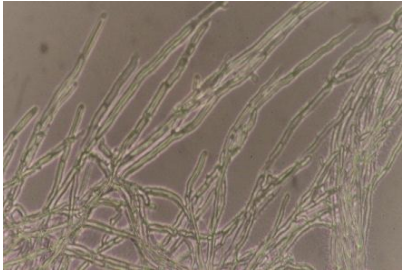
Fuente: El Autor

Anexo 7 Ficha técnica de *Cryptococcus laurentii*

FICHA TÉCNICA DE MOHOS Y LEVADURAS	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	
Responsable: Diana Hualpa	
Microorganismo: <i>Cryptococcus laurentii</i>	Código de almacenamiento: CASM001
Procedencia del m o: Sub productos de mango.	Fecha de aislamiento: 4 Febrero 2013
Nivel de seguridad: 2*	Medio de conservación: Caldo Saboraud; Glicerol 10% v/v Agua destilada estéril; Temperatura: -80° C
Almacenamiento: Tubos Eppendorf de 1.5 ml a - 80° C	En el cepario desde: Febrero del 2013
Condiciones de crecimiento:	Características Morfológicas
Medio de cultivo: Agar PDA o Sabouraud	Anverso 
Características Macroscópicas: colonia de color cremoso, su forma es completamente redonda, su parte central es bien definida, por el reverso se puede ver que el centro esta bien arraigado al agar.	Reverso 
Características microscópicas: células levaduriformes esféricas y alargadas, blastoconidias	Fotomicrografía 
Medidas de protección y manipulación:	Personal: Usar el equipo de protección usual (mandil, guantes, cofia, mascarilla) Desechos: Destruir el m-o en autoclave y desechar apropiadamente. Higiene personal: Lavado de manos y desinfección.
* El personal debe tener entrenamiento en el manejo de agentes patógenos; restringir el acceso al laboratorio; tener cuidado con salpicaduras y aerosoles	

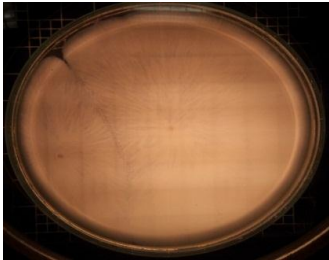
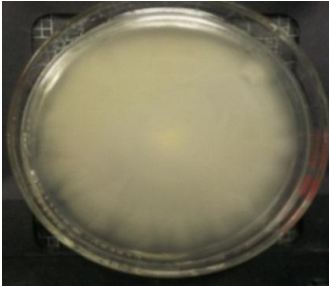
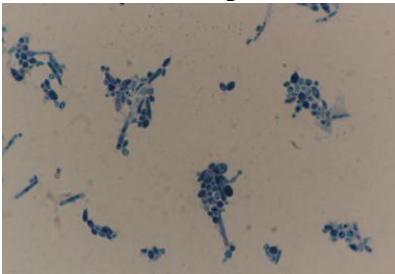
Fuente: El Autor

Anexo 8 Ficha técnica de *Geotrichum Candidum* Link

FICHA TÉCNICA DE MOHOS Y LEVADURAS	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	
Responsable: Diana Hualpa	
Microorganismo: <i>Geotrichum Candidum</i> Link	Código de almacenamiento: CASM001
Procedencia del m o: Sub productos de mango.	Fecha de aislamiento: 4 Febrero 2013
Nivel de seguridad: 2*	Medio de conservación: Caldo Saboraud; Glicerol 10% v/v Agua destilada estéril; Temperatura: -80° C
Almacenamiento: Tubos Eppendorf de 1.5 ml a - 80° C	En el cepario desde: Febrero del 2013
Condiciones de crecimiento:	Características Morfológicas
Medio de cultivo: Agar PDA	Anverso 
Características Macroscópicas: colonia de color blanco algodónado, aterciopelada, por el reverso es de color amarillo pardo y el centro es más oscuro	Reverso 
Características microscópicas: Presenta hifas ramificadas tipo aéreas; ruptura de hifas fértiles en algunos extremos	Fotomicrografía 
Medidas de protección y manipulación:	Personal: Usar el equipo de protección usual (mandil, guantes, cofia, mascarilla) Desechos: Destruir el m-o en autoclave y desechar apropiadamente. Higiene personal: Lavado de manos y desinfección.
* El personal debe tener entrenamiento en el manejo de agentes patógenos; restringir el acceso al laboratorio; tener cuidado con salpicaduras y aerosoles	

Fuente: El Autor

Anexo 9 Ficha Técnica de *Pichia fermentans*

FICHA TÉCNICA DE MOHOS Y LEVADURAS	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS	
Responsable: Diana Hualpa	
Microorganismo: <i>Pichia fermentans</i>	Código de almacenamiento: CASM001
Procedencia del m o: Sub productos de mango.	Fecha de aislamiento: 4 Febrero 2013
Nivel de seguridad: 2*	Medio de conservación: Caldo Saboraud; Glicerol 10% v/v Agua destilada estéril; Temperatura: -80° C
Almacenamiento: Tubos Eppendorf de 1.5 ml a - 80° C	En el cepario desde: Febrero del 2013
Condiciones de crecimiento: Medio de cultivo: Agar PDA	Características Morfológicas
	Anverso 
Características Macroscópicas: Colonia de color blanco aterciopelado, a los 7 días ocupa el mayor espacio disponible, por el reverso es de color semi amarillento con un centro no bien definido.	Reverso 
Características microscópicas: Presenta hifas, blastoconidias	Fotomicrografía 
Medidas de protección y manipulación:	Personal: Usar el equipo de protección usual (mandil, guantes, cofia, mascarilla) Desechos: Destruir el m-o en autoclave y desechar apropiadamente. Higiene personal: Lavado de manos y desinfección.
* El personal debe tener entrenamiento en el manejo de agentes patógenos; restringir el acceso al laboratorio; tener cuidado con salpicaduras y aerosoles	

Fuente: El Autor