



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

“ESTUDIO DEL EFECTO DE *Bacillus atrophaeus* Y LOS RECUBRIMIENTOS NATURAL SHINE Y SEMPERFRESH APLICADOS SOLOS O EN COMBINACIÓN EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*) SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS, ENZIMÁTICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS DEL FRUTO EN ETAPA POSCOSECHA.”

POR:

ITB PAULO ANTONIO GONZÁLEZ FLORES

PROPUESTA DE TESIS A LA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

DIRECTOR: DRA. MARTINA ALEJANDRA CHACÓN LÓPEZ

CODIRECTOR: DRA. EFIGENIA MONTALVO GONZÁLEZ

Tepic, Nay.

Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco todo el apoyo que me brindaron mis asesores de tesis, sin su guía no habría podido recorrer este camino.

Gracias al apoyo de mi familia y amigos que me dieron consuelo y alegrías para poder sobrellevar el día a día.

Agradezco y dedico este trabajo a mi difunta madre y a mi novia, sin el apoyo que me brindaron estaría perdido en mi camino, gracias por no dejar que me rindiera.

RESUMEN

El tomate es un fruto climatérico altamente perecedero, por lo que resulta de gran importancia el implementar medidas que permitan extender su vida de anaquel. Se consideró el uso de los recubrimientos comerciales Natural Shine y Semperfresh, así como la bacteria *Bacillus atrophaeus* quienes ya se han probado anteriormente en algunos frutos con resultados positivos. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la aplicación de los recubrimientos y la bacteria solos o en combinación sobre los parámetros fisiológicos, fisicoquímicos y enzimáticos del tomate en etapa poscosecha. El desarrollo de los tratamientos se llevó a cabo utilizando frutos en estado de madurez fisiológica, los recubrimientos se prepararon a diferentes concentraciones, tal como indica el proveedor (35% Natural Shine y 2% Semperfresh) y *B. atrophaeus* a 1.8×10^9 UFC/mL. Los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente y analizados los días 0,2,4,6 y 8, midiendo los parámetros de firmeza, grados Brix, pH, acidez titulable, pérdida fisiológica de peso, concentración de etileno y tasa respiratoria, así como la actividad de las enzimas Pectinmetilesterasa y β -galactosidasa. Como resultados se observa que en todos los análisis realizados los tratamientos en solitario muestran diferencias significativas con respecto al testigo, sin embargo Semperfresh por si solo presenta mayor efectividad sobre el retraso de la maduración, lo cual se evidencia aún más al combinarse con la bacteria, ya que los metabolitos que la bacteria genera podrían estar influyendo en la permeabilidad de la misma, pudiendo formar una capa doble o de mayor grosor, limitando el intercambio gaseoso e inhibiendo la producción de etileno endógeno y retrasando la actividad de las enzimas pectinolíticas, resultando en la extensión de la vida de anaquel del fruto. Se concluye que la aplicación de *B. atrophaeus* con Semperfresh consiguió un efecto aditivo y logró inhibir en mayor grado la producción de etileno y disminuir la tasa respiratoria, logrando así reducir la actividad de las enzimas pectinolíticas, conservando una mayor firmeza y reduciendo el efecto que tiene la maduración sobre los parámetros fisicoquímicos.

Palabras clave: Inhibición, etileno, aditivo.

ABSTRACT

Tomato is a highly perishable climacteric fruit, so it is very important to implement measures that specifically extend your shelf life. Consider the use of Natural Shine and Semperfresh commercial coatings, as well as *Bacillus atrophaeus* who have previously tested some results with positive results. The objective of this research was to study the effect of the application of coatings and bacteria alone or in combination on the physiological, physicochemical and enzymatic parameters of the tomato in the post-harvest stage. The development of the treatments was carried out using fruits in a state of physiological maturity, the coatings were prepared at different controls, as indicated by the supplier (35% Natural Shine and 2% Semperfresh) and *B. atrophaeus* at 1.8×10^9 CFU / mL. The fruits were stored at room temperature and analyzed on days 0,2,4,6 and 8, measuring the parameters of firmness, Brix degrees, pH, titratable acidity, physiological weight loss, ethylene concentration and respiratory rate, as well as the activity of pectinmethylesterase and β -galactosidase enzymes. As results are observed in all the analyzes performed the treatments alone changed the differences with respect to the control, however Semperfresh alone has greater efficacy on the delay of maturation, which is even more evident when combined with bacteria, since that the metabolites that the bacterium generates may be influencing its permeability, being able to form a double or thicker layer, limiting gas exchange and inhibiting the production of endogenous ethylene and delaying the activity of pectinolytic enzymes, resulting in extension of the shelf life of the fruit. It is concluded that the application of *B. atrophaeus* with Semperfresh achieved an additive and controlled effect, inhibiting to a greater extent the production of ethylene and reducing the respiratory rate, thus reducing the activity of the pectinolytic enzymes, maintaining a greater firmness and reducing the effect that it has maturation over physicochemical parameters.

Key words: Inhibition, ethylene, additive.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1. Generalidades del tomate..... | 4 |
| 2.1.1 Producción de tomate en México | 4 |
| 2.1.2 Constitución nutritiva del tomate | 5 |
| 2.2 Proceso de maduración del tomate | 5 |
| 2.2.1 Patrón de respiración y producción de etileno en tomate..... | 7 |
| 2.3 Efecto de las enzimas que deterioran la firmeza de los frutos | 7 |
| 2.3.1 Efecto de la pectinasas en frutos | 8 |
| 2.4 Estrategias y/o tratamientos para extender la vida de anaquel del tomate.... | 9 |
| 2.4.1 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)..... | 9 |
| 2.4.2 Recubrimientos en alimentos | 12 |
| CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN | 16 |
| CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS | 18 |
| CAPÍTULO 5. OBJETIVOS | 20 |
| 5.1 Objetivo general..... | 20 |
| 5.2 Objetivos específicos | 20 |
| CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 6.1. Selección de materia prima y preparación de tratamientos | 22 |
| 6.2 Selección y preparación de la Cepa | 22 |
| 6.3 Preparación de los recubrimientos..... | 22 |
| 6.4 Aplicación de <i>B. atropheus</i> y recubrimientos | 22 |
| 6.5 Muestreo de frutos de tomate | 23 |

| | |
|--|----|
| 6.6 Parámetros Fisiológicos de los frutos bajo estudio | 23 |
| 6.6.1 Evaluación del porcentaje de pérdida fisiológica de peso (%PFP)..... | 24 |
| 6.6.2 Determinación del patrón de respiración del fruto..... | 24 |
| 6.6.3 Determinación del patrón de producción de etileno en tomate. | 25 |
| 6.7 Evaluación de la actividad de enzimas pectinolíticas..... | 26 |
| 6.7.1 Determinación de la actividad de la Pectinmetilesterasa (PME). | 26 |
| 6.7.2 Determinación de la actividad de β -galactosidasa. | 27 |
| 6.7.3 Cuantificación de proteína..... | 28 |
| 6.7.4 Determinación de la Firmeza..... | 29 |
| 6.8 Determinaciones fisicoquímicas en los frutos de tomate | 29 |
| 6.8.1 Determinación de sólidos solubles totales (SST) | 29 |
| 6.8.2 Determinación del potencial de Hidrógeno (pH)..... | 29 |
| 6.8.3 Determinación de la acidez titulable..... | 29 |
| CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 32 |
| 7.1 Análisis de los análisis fisiológicos y evaluación de la firmeza del tomate... | 32 |
| 7.1.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP) | 32 |
| 7.1.2 Velocidad de producción de etileno (VPE) | 34 |
| 7.1.3 Velocidad de respiración (VR) en frutos de tomate. | 36 |
| 7.2 Evaluación de las enzimas pectinolíticas PME y β -gal. | 39 |
| 7.2.1 Actividad de la pectinmetilesterasa (PME). | 39 |
| 7.2.2 Actividad de β –galactosidasa..... | 42 |
| 7.2.3 Determinación de firmeza en frutos de tomate..... | 44 |
| 7.3 Parámetros fisicoquímicos..... | 47 |
| CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES..... | 52 |
| CAPÍTULO 9. Bibliografía..... | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 6. 1 Curva BSA para la cuantificación de proteína en PME y β -Gal..... | 28 |
| Figura 7.1 Pérdida fisiológica de peso de frutos de tomate al día 8 de almacenamiento. | 33 |
| Figura 7. 2 Velocidad de producción de etileno (VPE) de frutos de tomate testigo y tratados. | 35 |
| Figura 7.3 Velocidad de respiración (VR) de frutos de tomate testigo y tratados. | 38 |
| Figura 7. 4 Actividad de la PME de frutos de tomate testigo y tratados..... | 41 |
| Figura 7. 5 . Parámetro de la actividad de la β -gal de frutos de tomate testigo y tratados. | 43 |
| Figura 7. 6 Parámetro de firmeza en frutos de tomate testigo y tratados solos o en combinación. | 45 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 6. 1 Preparación de tratamientos aplicados en frutos de tomate solos y en combinación. | 23 |
| Cuadro 7. 1 Parámetros fisicoquímicos (SST, pH y acidez titulable) en frutos de tomate testigo y tratados solos o en combinación..... | 48 |

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El tomate es un fruto climatérico altamente producido en México y consumido en todo el mundo, sin embargo, su comercialización se dificulta debido a su rápida maduración, lo cual aumenta en gran medida su perecibilidad, acortando su vida de anaquel. La razón principal de su corta vida es la alta tasa de producción de etileno que el tomate por sus características climatéricas genera. Por lo anterior es de gran importancia implementar estrategias que atenúen el efecto de esta hormona que está involucrada en el proceso de maduración. Se ha reportado el uso de microorganismos y recubrimientos que tienen una acción inhibitoria en la respiración y la producción de etileno en diferentes frutos. Así, resulta conveniente evaluar el efecto de una cepa de *Bacillus* sobre el nivel de producción de etileno en frutos de tomate, así como su relación con su vida de anaquel,

Por otro lado, el uso de recubrimientos se ha aplicado en diferentes frutos para protegerlos y retrasar su vida de anaquel, por lo que en el presente proyecto se aplicó la bacteria promotora del crecimiento vegetal *Bacillus atropaeus* solo y en combinación con los recubrimientos semperfresh y natural shine en frutos de tomate con el fin de reducir el intercambio gaseoso interno y retrasar los cambios fisiológicos que aceleran la maduración. Los tratamientos se aplicaron en tomates en estado de madurez fisiológica (se considera que están en esta etapa los frutos que alcanzan los 11 N (Cantwell, 2004). En los frutos tratados se realizaron pruebas fisicoquímicas y de calidad como °Bx, pH, acidez titulable y firmeza. Además, se realizaron análisis fisiológicos en los frutos tratados como pérdida fisiológica de peso, determinación de la concentración de etileno y patrón de respiración, evaluando la producción de CO₂. Finalmente se evaluó el efecto de los tratamientos respecto a la actividad enzimática de aquellas enzimas involucradas en la degradación de la pared celular del tomate como son la pectinmetilesterasa y la β-galactosidasa.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las Solanáceas junto con el tabaco, el chile y la papa. Su nombre proviene del náhuatl, xictlitomatl, o “tomate de ombligo”, también conocido como tomate, coatomate o tomate bola. Es una planta herbácea con hojas alternas y flores en forma de estrellas, de color amarillo o blanco (SIAP, 2012).

La especie es originaria de Sudamérica pero su domesticación se llevó a cabo en México. Las principales variedades comerciales son: tomate bola, cherry, saladette, pera, beef, marmande, vemone, moneymaker, muchamiel, pometa tardío, san marzano, cocktail, ramillete y liso (Ronquillo, 2007).

El tomate es actualmente una de los frutos más ampliamente producidos, alcanzando un nivel de popularidad muy importante en todas las dietas del mundo, en el año 2010, se reportó una producción total de aproximadamente 129.942 millones de toneladas (FAO, 2011). En la actualidad existen más de 70 variedades de tomate, diferenciadas en su forma, tamaño, color y características internas como sabor, textura y dureza (Ríos y cols., 2003; Alvarado y cols., 2009).

2.1.1 Producción de tomate en México

México se encuentra en el décimo lugar en producción de tomate a nivel mundial con alrededor de 2 millones de toneladas anuales. Los principales estados productores son Sinaloa, Baja California y Baja California, San Luis Potosí y Michoacán. En México en el año 2012 tomate ocupó una superficie de 55,888 hectáreas con una producción de 2,838,369 toneladas, (SAGARPA, 2016).

2.1.2 Constitución nutritiva del tomate

El tomate constituye uno de los frutos de mayor interés en la nutrición humana por los beneficios que aporta su ingesta, debido a su riqueza en vitaminas, principalmente A y C, elementos minerales como el potasio, alto contenido de fibra soluble e insoluble, compuestos funcionales y un elevado contenido de agua (Ramos y cols., 2010). El consumo de este fruto es imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada. Su alto contenido en vitaminas y carotenos hacen al tomate un producto habitualmente incorporado en la dieta humana, por lo que se ha convertido en un cultivo de un enorme valor económico, tanto por la facilidad de su cultivo como por su versatilidad de uso en consumo como fruto fresco o procesado (Casado, 2004). Este fruto presenta propiedades que favorecen la salud, actuando en la prevención de problemas cardiovasculares y del cáncer, principalmente de próstata y de mama, debido su riqueza en carotenos (β -carotenos y licopenos), compuestos que actúan como potentes antioxidantes (Ramos y cols., 2010).

2.2 Proceso de maduración del tomate

El tiempo que tarda el tomate en madurar depende de las condiciones locales y del estado de desarrollo en el que el fruto es recolectado. La mayoría de las variedades alcanzan su tamaño máximo 40 a 50 días después de la floración y maduran en aproximadamente 14 días. Los tomates verdes son los que tardan más en madurar: 18 días a 13°C. Los tomates rosas pueden madurar en 10 días a esta misma temperatura. El tiempo hasta la madurez depende de la temperatura y puede ser disminuido a la mitad si ésta se eleva a 25°C (León, 2009).

La maduración comienza en los tomates cuando el fruto alcanza su tamaño máximo. Cuando esto sucede, la planta corta el flujo de agua hacia el fruto, y la clorofila, que le da el color verde, comienza a degradarse. La pigmentación aumenta y es

acompañada por una caída en la acidez y un ablandamiento de los tejidos y el almidón presente en el fruto comienza a convertirse en azúcares. Un compuesto destacado del tomate es el licopeno, el cual se encuentra en cantidades elevadas dentro de sus células. El licopeno es el componente responsable del color rojo del tomate y es objeto de numerosos estudios por su poder antioxidante, y como medida preventiva de diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares. En el proceso de maduración la hormona del etileno tiene un papel muy importante, ya que regula positivamente varias enzimas involucradas en el complejo proceso de maduración en frutos (León, 2009).

La hormona etileno (C_2H_4) es la principal causante de acelerar el proceso de maduración en frutos climatéricos, donde parámetros tales como el reblandecimiento de la pulpa (Haji y cols., 2003; Hiwasa y cols., 2003), el cambio de color (Flores y cols., 2002), y la producción de volátiles (aroma) dependen en gran medida de la producción de C_2H_4 (Rupasinghe y cols., 2000; Alexander y Grierson 2002; Flores y cols., 2002). El etileno tiene la característica de aumentar la actividad metabólica de los frutos, acelerando su maduración y senescencia. Esta hormona aun en bajas concentraciones tiene efectos marcados sobre los frutos, especialmente en los climatéricos, de forma tal que aumenta su tasa respiratoria contribuyendo a la degradación de la clorofila.

De manera general, en primera instancia se considera que el etileno une a receptores en la membrana celular que contienen un sitio que enlaza al etileno con su sitio amino terminal y regiones con homología a las histidin quinazas y reguladores de respuesta en su grupo carboxilo terminal (Gamble y cols., 1998).

Posteriormente se desencadena una serie de reacciones en la que se realiza una compleja transmisión de señales que emigran al núcleo de la célula y causan cambios en la lectura del ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual a su vez se transcribe en forma de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm). Los ARNm son traducidos a proteínas en los polirribosomas en donde se forman los polipéptidos que estructuran las enzimas que causan respuesta al etileno, dichas enzimas son las responsables de degradar las pectinas que forman la pared celular, las cuales

se relacionan directamente con la firmeza y vida de anaquel del fruto (Reid, 1985; Kader, 1992)

2.2.1 Patrón de respiración y producción de etileno en tomate

Según Artés (2007) el tomate tiene un comportamiento respiratorio tipo climatérico, con una intensidad relativamente elevada dependiente de la temperatura (10, 15, 22, 35 y 43 mg CO₂/kg h a 5, 10, 15, 20 y 25°C, respectivamente) y una emisión de etileno moderada de 5 a 8 µl de etileno/kg h a 12°C y de 3 a 10 µl de etileno/kg h a 20°C, con un máximo de emisión etilénica coincidente o algo retrasada respecto al pico respiratorio. El tomate es muy sensible al efecto de esta fitohormona, con un umbral de 0.5 ppm. Los considerables cambios físicos y químicos que suceden en la maduración del tomate durante el climaterio se manifiestan en una rápida evolución del color verde, con degradación de clorofilas hacia tonos anaranjados y rojos, acompañado de un descenso de la firmeza, una ligera disminución de la acidez y un reducido aumento de los sólidos solubles. En tal sentido, este producto sufre elevadas pérdidas en la etapa de poscosecha, que pueden alcanzar el 50% de la cosecha, incluso en países industrializados.

2.3 Efecto de las enzimas que deterioran la firmeza de los frutos

La firmeza de los frutos está relacionada con la estructura y organización de las paredes celulares y sustancias intercelulares (Eskin y Hoehn, 2013). Los cambios en la textura que se producen durante la maduración de frutos, se deben principalmente a la hidrólisis enzimática sobre la arquitectura de la pared celular constituida por pectinas. La acción de las pectinasas juega un papel importante en la alteración de las características de la textura del fruto en que estén interviniendo. Dos de las enzimas más importantes y que son objeto de estudio debido a la acción degradativa que tienen sobre la pared celular son las siguientes: Pectinmetilesterasa (PME, EC 3.1.1.11) y β-galactosidasa (β-gal, EC 3.2.1.23) (Seymour y cols., 1993).

2.3.1 Efecto de la pectinasas en frutos

Como se ha mencionado, las enzimas pectinasas tienen un efecto muy importante en el ablandamiento de la pared celular de los frutos, dos de las más relevantes y que son objeto de estudio en este proyecto son la PME y β -gal. La PME promueve la desesterificación de la pectina, actúa en la posición adyacente al grupo carboxilo libre, y de un 65% a 75% de los grupos carboxilo de la pectina son desesterificados. Esta desesterificación facilita la depolimerización de las pectinas, dando como resultado el acortamiento de las cadenas de propectina y compuestos pécticos; actúan sobre los enlaces α -D-1,4-glucosídicos de los restos no esterificados, (Brownleade y cols., 1999).

Las pectinas llamadas galactanos y arabinogalactanos tiene enlaces β -gal. La enzima β -gal está ampliamente distribuida en varios tejidos de las plantas, incluyendo en el desarrollo de la fruta y tiende a aumentar su actividad durante la maduración (Pressey,1983). Estudios en manzanas han indicado un aumento marcado en la actividad de esta enzima durante la maduración, sugiriendo la participación de esta enzima en la degradación de la pared celular (Ranwala y cols., 1992).

Por lo tanto, resulta importante buscar estrategias para extender la vida de anaquel del tomate, el estudio y evaluación de la actividad de las enzimas que degradan la pared celular del tomate será de gran importancia para elucidar el posible mecanismo de acción de *Bacillus atrophaeus* y los recubrimientos con base en ceras. A Continuación, se mencionan algunas que sirven de referencia para este estudio.

2.4 Estrategias y/o tratamientos para extender la vida de anaquel del tomate

2.4.1 Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)

Se ha reportado que diversas bacterias que colonizan la rizósfera favorecen el crecimiento de las plantas, las cuales son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Ashrafuzzaman y cols., 2009; Beneduzi y cols., 2012). Son capaces de estimular el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos como lo son: fijación biológica de nitrógeno; solubilización de fosfatos; síntesis de fitohormonas, como las auxinas y principalmente el ácido indolacético (AIA); e (iv) inhibición del desarrollo de microorganismos fitopatógenos por la síntesis de antibióticos o sideróforos (Khan y cols., 2007; Lucy y cols., 2004; Saharan y Nehra, 2011; Vessey, 2003).

Bashan y de-Bashan (2010), destacan que las BPCV actúan como elicitores naturales mejorando el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Por consiguiente, el empleo de insumos con base en BPCV, aplicados a frutos y plantas, es una alternativa biotecnológica para la producción de cultivos agrícolas, reduciendo la aplicación de fertilizantes sintéticos y agroquímicos que deterioran el ambiente (Yang y cols., 2009). Se ha demostrado que la inoculación con BPCV tales como *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* ha logrado mejorar el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate, así como un efecto inhibitorio en la producción de etileno, lo cual propicia la extensión de la vida de anaquel, (Noh y cols., 2014; Rojas-Solís y cols., 2016; Santillana y cols., 2005).

Las bacterias del genero *Bacillus sp.* producen ciertos metabolitos que favorecen el crecimiento vegetal de frutos y plantas, entre los que se encuentran la surfactina, fengicina, iturina A, B, y C, micosubtilinas, bacilomicinas y biosurfactantes activos de membrana con potente actividad antifúngica (Voltolini, 2010).

Entre estos metabolitos destacan: la surfactina el cual es un heptapéptido vinculado a un ácido graso β -hidroxi que consiste en 13-15 átomos de carbono los cuales forman una estructura cíclica de lactona. Este antibiótico se comporta como un potente biotensioactivo que además posee otras actividades biológicas, entre ellas la alteración de la integridad de membrana, como consecuencia de fuertes interacciones con los constituyentes de la membrana fosfolipídica (Alvarez y cols., 2012). La familia Iturina comprende la bacilomicina, iturina y micosubtilina los cuales son lipoheptapéptidos cíclicos, constituidos por un ácido graso unido a residuos de aminoácidos. La bacilomicina químicamente está compuesta por un ácido graso β -amino y 7 α aminoácidos. Este lipopéptido exhibe una fuerte actividad antifúngica (Moyne y cols., 2001; Ramarathnam y cols., 2007). Por el mecanismo de la acción antibiótica de la bacilomicina D, las moléculas de los lipopéptidos penetran en la membrana citoplasmática de la célula diana y forman estructuras oligoméricas (agregados de lipopéptidos).

Un estudio previo a este proyecto realizado en nuestro grupo de trabajo se estudió el efecto de algunas de estas bacterias promotoras con el objetivo de alargar la vida útil de diversos frutos. En 2016, Aldape y cols., aplicaron rizobacterias en frutos de guanábana destacando por su efectividad *Bacillus subtilis*, con el cual logró obtener resultados favorables, extendiendo la vida de anaquel del fruto de guanábana, esto al inhibir la formación de ACC (precursor directo del etileno) por medio de una enzima producida por la misma bacteria (ACC desaminasa).

En otro estudio se aplicó *Bacillus subtilis* en frutos de fresa con resultados positivos en su vida de anaquel. Se analizó la expresión de tres genes que codifican para tres enzimas pectolíticas, las cuales son: la pectinmetilesterasa, la poligalacturonasa y la pectinliasa, consideradas como enzimas que degradan la pared celular, lo que provoca en gran medida el ablandamiento del fruto, de esta manera se detectó una disminución de la expresión de los tres genes estudiados, lo cual resultó en el aumento de la vida de anaquel del fruto de fresa (Garcia-Aceves y cols., 2012). Asimismo, en tomate se analizó la firmeza del fruto, teniendo como resultado una mayor firmeza durante su desarrollo en la planta cuando se le aplica la bacteria *B.*

subtilis manteniendo el fruto con mayor firmeza con respecto al control (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007).

Como se ha reportado en diferentes estudios, la bacteria *Bacillus subtilis* ha sido aplicada con éxito para extender la vida de anaquel de frutos, razón por la cual el interés de este proyecto fue probar otra bacteria del género *Bacillus*, la especie *atrophaeus* para probar su efecto sobre la vida de anaquel de frutos de tomate sobre su vida de anaquel.

También en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado a *Bacillus atrophaeus* como bacteria biocontroladora, Guardado y cols., (2016) reportaron su efectividad sobre el control de *Colletotrichum sp.* y *Alternaria sp.*, inhibiendo el crecimiento micelial y la esporulación. Asimismo, se logró inducir el sistema de defensa en tomate y otros frutos como el aguacate, por lo que se consideró analizar el efecto de esta bacteria en la vida de anaquel de tomate.

2.4.1.1 *Bacillus atrophaeus*

Bacillus atrophaeus muestra una alta actividad en la colonización de raíces y la protección de plantas y cultivos. Con la creciente demanda de pesticidas biotecnológicos ecológicamente seguros en la industria de plantas y cultivos, que pueden ser alternativas a los pesticidas químicos, las cepas de *Bacillus* endofíticas y rizoféricas que promueven el crecimiento de las plantas, se usan ampliamente en la biotecnología moderna. La cepa de *Bacillus atrophaeus* tiene la capacidad de colonizar raíces de plantas e inhibir el crecimiento de fitopatógenos fúngicos y bacterianos en plántulas inoculadas y frutos cosechados (Lapa, 2005). Algunos análisis modernos que utilizan múltiples métodos genéticos han encontrado a la bacteria *B. atrophaeus* características similares a *B. subtilis*, ya que *B. atrophaeus*, presenta algunos mecanismos del biocontrol de las rizobacterias, tal como la antibiosis, la inducción de la resistencia sistémica, la competencia por nutrientes y nichos, así como la producción de sideróforos y compuestos antimicrobianos

(Lemessa y Zeller, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Beneduzi y cols., 2012; Ashrafuzzaman y cols., 2009). La capacidad de las rizobacterias para producir sideróforos y metabolitos que contribuyen a la antibiosis ha sido el objetivo de muchos estudios dedicados a la investigación de PGPR. Una característica sobresaliente del género *Bacillus* sp es que pueden ser aplicadas como agentes biocontroladores, sus metabolitos pueden además inducir el sistema de defensa de los frutos y otra característica importante es su efecto positivo en la vida de anaquel de frutos de importancia agroalimentaria.

Además de las PGPR como medidas para extender la vida de anaquel de los frutos, otras alternativas, que se ha probado en frutos es la aplicación de diferentes recubrimientos. En este proyecto se plantea además del uso de *B. atropheus*, la aplicación de los recubrimientos semperfresh y natural shine, los cuales se describirán a continuación.

2.4.2 Recubrimientos en alimentos

Los recubrimientos, son una capa delgada que se forma directamente sobre la superficie de los alimentos como una envoltura protectora (Del Valle y cols., 2005). Estos se elaboran a partir de una gran variedad de proteínas, polisacáridos y lípidos, ya sea como componentes únicos o combinados (Kester y Fennema, 1986). El mecanismo por el cual conservan la calidad de frutas y vegetales es debido a que constituyen una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua que retrasa su deterioro (Krochta y Mulder-Johnston, 1997), controlan la respiración y la senescencia de forma similar a las atmósferas modificadas y además mejoran las propiedades sensoriales, ayudan a mantener la integridad estructural del producto que envuelven, a retener compuestos volátiles y también pueden actuar como vehículo de aditivos alimentarios (Tanada y Grosso, 2005).

Entre estos recubrimientos se encuentran semperfresh y natural shine que han sido probado en cítricos y se encuentran bajo estudio la aplicación de estos recubrimientos en otros frutos.

2.4.2.1 Recubrimiento Semperfresh

Semperfresh es un recubrimiento que como componente activo tiene sucroésteres de ácidos grasos que se utilizan comúnmente en la industria frutícola para mantener la calidad durante el almacenamiento y prolongar la vida poscosecha. Semperfresh se ha utilizado por algunos de los principales productores / empaques en Estados Unidos y América del Sur desde hace varios años (Hugh 2009).

El recubrimiento crea una película de permeabilidad selectiva que inhibe la pérdida de agua al mismo tiempo que permite el intercambio de gases entre el fruto y su ambiente. La atmósfera modificada que se crea por Semperfresh reduce la pérdida de peso y el exceso de respiración, dando como resultado frutos más firmes (Hugh 2009).

El producto puede aplicarse en un tanque por inmersión, flujo, drencher (lluvia) o pulverización, y puede mezclarse con todos los fungicidas usados comúnmente (Hugh 2009).

2.4.2.2 Recubrimiento Natural shine

Natural shine es un recubrimiento que tiene como ingrediente activo la carnauba es un tipo de cera que se obtiene de las hojas de la palma *Copernicia prunifera* (Parish y cols., 2002).

Esta cera es muy conocida por el recubrimiento que forma, el cual otorga excelentes características y tiene infinidad de aplicaciones. La cera de carnaúba es reconocida por sus propiedades de brillo. Combina dureza con resistencia al desgaste. Su punto de fusión es de 78 a 85°C, el más alto entre las ceras naturales lo cual permite su manejo y el ser mezclada con otros componentes (Parish y cols., 2002).

La cera de carnauba contiene principalmente ésteres de ácidos grasos (80-85%), alcoholes grasos (10 a 15 %), ácidos (3 a 6 %) e hidrocarburos (1 a 3%). La cera de carnaúba tiene dioles esterificados grasos (cerca 20 %), ácidos grasos hidroxilados (cerca del 6 %) y ácido cinámico (cerca de 10 %). El ácido cinámico, es un antioxidante, puede ser hidroxilado o metoxilado (Uwe y cols., 2002).

Es un ingrediente indispensable en la elaboración de ceras emulsificadas para el encerado de frutas como manzanas, cítricos, pepinos, plátanos entre otras. El encerado se aplica como tratamientos de postcosecha logrando alargar su vida de anaquel y conservando su apariencia y lozanía; esto es debido a que disminuye la transpiración y lo cual inhibe en cierto grado la deshidratación, al mismo tiempo que ayuda a preservarlas de fungosis y bacteriosis y mantiene el brillo natural de las frutas (Uwe y cols., 2002).

Como se ha mencionado, tanto microorganismos pertenecientes a las PGPR's como los recubrimientos con base en ceras son eficientes en la prolongación de la vida de anaquel en frutos. Por ello resulta importante comprobar si su efecto se ve potenciado a través de la combinación de tratamientos, lo cual puede ser propuesto como una estrategia que contribuya a disminuir las altas pérdidas que se tienen anualmente en tomate.

CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

México ocupa el décimo lugar a nivel mundial en la producción de tomate, esto se ve reflejado en una fuente económica importante para el país, sin embargo, al ser un fruto climatérico con una alta respiración y producción de etileno se dificulta su exportación a otros estados, así como a otros países debido a la alta perecibilidad que presenta, resultando en una vida de anaquel muy corta. Es por esto que se ve la necesidad de explorar estrategias que permitan extender la vida útil de este fruto climatérico.

Se ha reportado que la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o el uso de recubrimientos han sido positivos en la preservación de la firmeza de los frutos, por lo que resulta conveniente aplicarlos en frutos de tomate y evaluar su efecto al ser aplicados solos o en combinación, para determinar las condiciones de tratamientos más efectivas que aminoren el proceso de maduración en los frutos de tomate, permitiendo extender su vida de anaquel y por ende su periodo de comercialización.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

La combinación de *B. atropaeus* con los recubrimientos Semperfresh y Natural shine disminuirán en mayor medida la actividad enzimática, procesos fisiológicos y fisicoquímicos del tomate, retrasando la maduración de los frutos de tomate, extendiendo así su vida de anaquel.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Estudiar el efecto de la aplicación de *Bacillus atrophaeus*, y recubrimientos solos o en combinación sobre los parámetros fisiológicos, fisicoquímicos y enzimáticos del tomate (*Solanum lycopersicum*) en etapa poscosecha.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la aplicación de *Bacillus atrophaeus*, y dos recubrimientos comerciales solos o en combinación en tomate, midiendo parámetros fisiológicos.
- Medir el efecto de la aplicación de *Bacillus atrophaeus*, y dos recubrimientos comerciales solos o en combinación sobre la actividad de las enzimas pectinmetilesterasa y β -galactosidasa, así como los cambios en la firmeza del fruto.
- Evaluar el efecto de la aplicación de *Bacillus atrophaeus*, y dos recubrimientos comerciales solos o en combinación en tomate, midiendo parámetros fisicoquímicos.

CAPITULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Selección de materia prima y preparación de tratamientos

Los frutos de tomate se adquirieron en el mercado local de Tepic, Nayarit, México en estado de madurez verde o madurez fisiológica. Los recubrimientos (Natural shine y Semperfresh fueron proporcionados por el INIFAP Campus Santiago Ixcuintla, Nayarit.

6.2 Selección y preparación de la Cepa

De acuerdo a los resultados obtenidos por Guardado y cols., (2016) se seleccionó la cepa de *B. atropheus* B5, debido a sus propiedades en la disminución de la severidad e incidencia de patógenos en frutos de aguacate y guanábana.,

Para la preparación de la cepa se colocaron dos matraces, conteniendo cada uno 100 mL de medio KB líquido. A partir de un preinóculo, se inocularon los medios de cultivo y se estandarizaron a un valor de 0.01 de absorbancia. Se incubaron a 25 °C durante 72 h con agitación constante. Posterior a las 24 h se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Por medio de una curva de calibración se estableció que a estos valores corresponden a una concentración de 1.8×10^9 UCF/mL; en este punto el caldo obtenido se utilizó como tratamiento en frutos de tomate. Como blanco se utilizó medio KB.

6.3 Preparación de los recubrimientos

Los recubrimientos tanto semperfresh como natural shine fueron preparados a las concentraciones indicadas por el proveedor (2% y 35% respectivamente), los recubrimientos se mezclaron con medio KB.

6.4 Aplicación de *B. atropheus* y recubrimientos

En el cuadro 6.1 se muestran las condiciones para los 6 tratamientos evaluados en frutos de tomate. Posterior al tratamiento, los frutos se colocaron en una mesa con

condiciones asépticas, se dejaron secar y se almacenaron a temperatura ambiente para posteriores análisis.

Cuadro 6. 1 Preparación de tratamientos aplicados en frutos de tomate solos y en combinación.

| Tratamiento | Formulación |
|---|-----------------------------------|
| Testigo | Medio KB |
| <i>Bacillus atrophaeus</i> | 1.8x10 ⁹ UFC/mL |
| Natural shine (NS) | 35% NS + 65% medio KB |
| Semperfresh (SF) | 2% SF + 98% medio KB |
| Natural shine (NS) + <i>B. atrophaeus</i> | 35% NS + 65% <i>B. atrophaeus</i> |
| Semperfresh (SF) + <i>B. atrophaeus</i> | 2% SF + 98% <i>B. atrophaeus</i> |

KB es el medio utilizado para el crecimiento de *B. atrophaeus*.

6.5 Muestreo de frutos de tomate

Para medir los parámetros fisiológicos se utilizaron 3 frutos por tratamiento, midiendo diariamente la velocidad de respiración (VR) y producción de etileno (VPE) del día 1 al día 8 de almacenamiento a temperatura ambiente.

Para medir parámetros fisicoquímicos, se utilizaron 3 frutos por tratamiento para cada día de evaluación. Los análisis se hicieron a los días 0, 2, 4, 6 y 8; a los mismos días se tomó muestra para la evaluación de la actividad de las enzimas PME y β -gal.

6.6 Parámetros Fisiológicos de los frutos bajo estudio

Para verificar el efecto de los tratamientos bajo estudio, se analizaron algunos parámetros fisiológicos como la pérdida fisiológica de peso, el patrón de respiración del fruto y la medición de la producción de etileno. A continuación, se describen las técnicas empleadas para realizar estos análisis.

6.6.1 Evaluación del porcentaje de pérdida fisiológica de peso (%PFP)

Los frutos con y sin tratamiento se pesaron diariamente usando una báscula digital, donde los resultados se expresaron como porcentaje de peso fresco perdido sobre la base del peso inicial del fruto (Lester y Burton, 1986), de acuerdo a la ecuación 1.

$$\% = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso actual}}{\text{Peso actual}} \times 100 \dots \text{Ec 1}$$

6.6.2 Determinación del patrón de respiración del fruto.

La velocidad de respiración (VR) se determinó colocando el fruto en un recipiente de vidrio hermético durante 1 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de la mezcla de aire del espacio libre de cabeza, a través de un septum en la cámara, por medio de una jeringa de vidrio de alta precisión. Se inyectó al cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 6890; equipado con dos electrodos; la determinación del CO₂ se llevó a cabo en el electrodo de conductividad térmica (Tovar y cols., 2001).

Se usó una columna HP-Plot Q de 1.5 m x 0.53 mm y 40 mm de espesor de película. La temperatura del puerto de inyección y de los detectores fue de 250°C. Se utilizó como gas acarreador helio a un flujo de 7 mL/min. La velocidad de respiración se reportó en mL CO₂ / kg-h, la cual se calculó mediante la ecuación 2:

$$\frac{\text{ml CO}_2}{\text{kg} \cdot \text{h}} = \left(\frac{D * C}{E * F * J} \right) \left[\left(\frac{G * L}{I} \right) - \left(\frac{G * K}{H} \right) \right] \quad \text{Ec.2}$$

Donde:

C = Concentración de CO₂ en el estándar (2%)

D = Volumen libre en la cámara (mL)

E = Peso del fruto (kg)

F = Tiempo de la ciruela dentro de la cámara (h)

G = Volumen de inyección del estándar (mL)

H = Volumen de inyección del aire del ambiente (mL)

I = Volumen de inyección (mL)

J = Área registrada en el cromatograma para el CO₂ del estándar

K = Área registrada en el cromatograma para el CO₂ del aire del ambiente

L = Área registrada en el cromatograma para el CO₂ de la muestra

6.6.3 Determinación del patrón de producción de etileno en tomate.

La producción de etileno se efectuó en forma similar a la velocidad de respiración (Tovar y cols., 2001). Se tomó muestra de la mezcla de aire del espacio libre de cabeza, a través de un septum en la cámara, por medio de una jeringa de vidrio de alta precisión y se inyectó al cromatógrafo de gases provisto de un detector de ionización de flama para la determinación del etileno. El etileno se reportó en $\mu\text{L}/\text{kg} - \text{h}$ de acuerdo a la ecuación 3:

$$\frac{\mu\text{l}}{\text{kg} - \text{h}} = \left(\frac{\text{D} * \text{C}}{\text{E} * \text{F} * \text{I}} \right) \left[\left(\frac{\text{G} * \text{J}}{\text{H}} \right) \right] \quad \text{Ec.3}$$

Donde:

C = Concentración de etileno en el estándar (0.0113 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

D = Volumen libre en la cámara (mL)

E = Peso del fruto (kg)

F = Tiempo del fruto dentro de la cámara (h)

G = Volumen de inyección del estándar (mL)

H = Volumen de inyección (mL)

I = Área registrada en el cromatograma para el etileno del estándar

J = Área registrada en el cromatograma para el etileno de la muestra

6.7 Evaluación de la actividad de enzimas pectinolíticas

Después de la aplicación de los distintos tratamientos con *B. atropurpureus* y los recubrimientos de semperfresh y natural shine, se tomaron muestras y se mantuvieron en congelación (-80°C). Con el fin de verificar el efecto sobre la vida de anaquel del fruto, se determinó la actividad de las enzimas pectinmetilesterasa y β -galactosidasa, que son enzimas clave en la degradación de la pared celular que propician el ablandamiento en el epicarpio del fruto.

6.7.1 Determinación de la actividad de la Pectinmetilesterasa (PME).

La obtención del extracto enzimático se realizó de acuerdo al método reportado por Azza y cols., (1995). La extracción se realizó a 4°C. Se emplearon 10 g de pulpa de tomate y se agregaron 20 mL de búfer de extracción (NaCl 1.6 M); se homogeneizó por 15 s utilizando un agitador magnético y se dejó en reposo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 11000 rpm por 1 h y el sobrenadante se utilizó para medir la actividad de la enzima pectinmetilesterasa (PME).

La actividad enzimática de PME se determinó por el método descrito por Hagerman y Austin (1986). La reacción se llevó a cabo con 2 mL de pectina al 1% (utilizando NaOH para ajustar su pH a 7.5) como sustrato, 0.3 mL de azul de bromotimol y 0.25 mL de agua desionizada, esta mezcla se incubó a 37°C por 5 min, posteriormente se añadió 0.1 mL de extracto enzimático y se dejó reaccionar por 1 h.

Una unidad de actividad de la enzima (U) fue definida como el aumento de la absorbancia de 0.001 por min a temperatura ambiente (Montalvo y cols., 2009) y una unidad de actividad específica se refiere a las unidades de actividad por mg de proteína (U/mg proteína)

Se midió la absorbancia de cada tubo a 620 nm en un espectrofotómetro (GBC). Para calcular la actividad se empleó la ecuación 4.

$$\text{Actividad específica} \left(\frac{U}{\text{mg proteína}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta OD}{V_{mR} * t} \right) * (df)}{\left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{proteína} \right)} \quad \text{Ec.4}$$

Dónde:

ΔOD =Cambio en la absorbancia de tiempo 0 a 15 min

V_{mR} =Volumen (mL)de la mezcla de reacción

t =tiempo de reaccion final

df =factor de dilución

6.7.2 Determinación de la actividad de β -galactosidasa.

La obtención del extracto enzimático se realizó a 4°C. A 10 g de pulpa de tomate se le agregaron 20 mL de amortiguador de citrato de sodio 0.1 M (pH = 4.6) conteniendo 1 M de NaCl, 0.5% (p/v) de polivinilpirrolidona y 10 mM de 2-mercaptoetanol. La mezcla se homogeneizó en un agitador magnético por 30 min y posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm por 60 min. El sobrenadante se usó para analizar la actividad (Lazan y cols., 1986).

La mezcla de reacción para determinar la actividad de la β -galactosidasa consistió en 0.52 mL de amortiguador de citrato de sodio 0.1M (pH4.6) y 0.4 mL de p-nitrofenil- β -D-galactopiranososa 13 mM como sustrato. Esta mezcla se incubó a 37°C por 10 min, después se añadió 0.08 mL del extracto enzimático y se dejó reaccionar 15 min. Para detener la reacción se añadieron 2 mL de carbonato de sodio 0.2 M. Los grupos p-nitrofenil formados se determinaron midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro (GBC) a 415 nm (Lazan y cols., 1993), posteriormente del extracto inicial se tomó muestra para la cuantificación de proteína.

6.7.3 Cuantificación de proteína.

La determinación de proteína se realizó por el método descrito por Bradford (1976). Se dejó reaccionar 2 mL del reactivo de Bradford y 0.1 mL del extracto enzimático por 10 min; posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm. Para cuantificar la proteína se realizó una curva estándar (utilizando concentraciones 0.5, 1.5, 2.5, 3 y 5) con albúmina de suero bovino (ASB) tal como se describe en la ecuación 5, además se observa en la figura 6.1 la curva que fue utilizada.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{(U/ml)/(mg/ml)}{FD} \quad \text{Ec.5}$$

Donde:

U/mL: Unidades por mililitro

mg/mL= miligramos por mililitro de proteína

FD= Factor de dilución

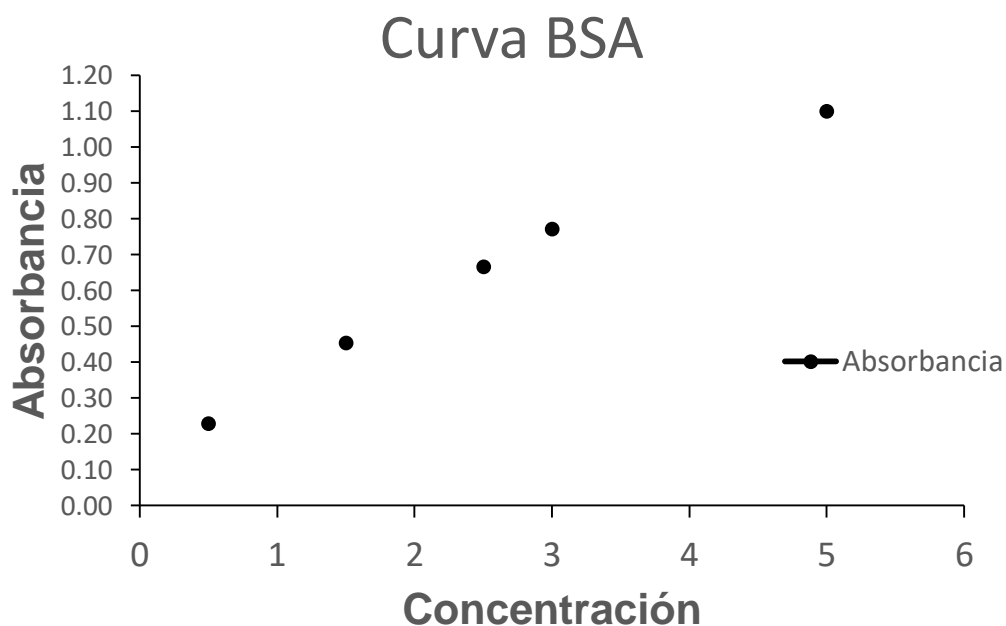


Figura 6. 1 Curva BSA para la cuantificación de proteína en PME y β -Gal

6.7.4 Determinación de la Firmeza

Para la determinación de la firmeza se utilizó un texturómetro universal equipado con un punzón de 10 mm de diámetro; empleando la prueba de penetración en 3 puntos a lo largo del fruto con cáscara (extremos y medio). Se registraron la fuerza de resistencia al corte y los resultados se expresaron en Newtons (N) (Dadzie y Orchard, 1997).

6.8 Determinaciones fisicoquímicas en los frutos de tomate

Para complementar las evaluaciones fisiológicas y enzimáticas se evaluaron los parámetros fisicoquímicos más relevantes en relación con la vida de anaquel del fruto. A continuación, se describen las técnicas empleadas para evaluar cada parámetro.

6.8.1 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Para la determinación de los SST se extrajo pulpa del fruto y con ayuda de un filtro se obtuvieron gotas de la pulpa para realizar la medición en un refractómetro Atago. Los resultados se reportaron en °Brix (A.O.A.C, 1990).

6.8.2 Determinación del potencial de Hidrógeno (pH)

La pulpa del fruto fue molida hasta obtener una masa homogénea donde se introdujo el electrodo para la medición del pH, el cual se determinó utilizando un potenciómetro marca Hanna Instrument pH 300 (A.O.A.C, 1990).

6.8.3 Determinación de la acidez titulable

Se determinó por técnica volumétrica empleando 5 g de muestra homogeneizada en agua destilada, titulando con NaOH 0.1 N valorado con fenolftaleína como indicador. Los cálculos se reportaron en % de ácido cítrico, utilizando la ecuación 6 (A.O.A.C, 1990).

$$\% \text{ Ac. Cítrico} = \frac{(\text{mL. gastados de NaOH})(\text{N del NaOH})(\text{meq.Ac.cítrico})}{\text{g de muestra}} \times 100 \quad \text{Ec.6}$$

CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis de los análisis fisiológicos y evaluación de la firmeza del tomate

7.1.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Un parámetro muy importante para conocer el efecto de un tratamiento sobre la fisiología de un fruto es la PFP.

En la Figura 7.1 se muestra la pérdida fisiológica de peso de frutos de tomate. Los frutos testigo tuvieron una mayor pérdida de peso (7.28%); seguido de los frutos tratados con *B. atrophaeus* (6.90%), natural shine (6.78%) y frutos tratados con *B. atrophaeus* + natural shine (6.57%); sin embargo, los mejores tratamientos para disminuir la PFP del tomate fue la aplicación del recubrimiento semperfresh (6.32%) y el tratamiento combinado de semperfresh con *B. atrophaeus* (6.04%).

Esta disminución de pérdida de peso cuando los frutos de tomate fueron tratados con *B. atrophaeus* puede explicarse en virtud de que esta bacteria genera una biopelícula tipo biofilm que estaría actuando como una barrera para disminuir la pérdida de agua (Hugh 2009). Por otro lado, también debe tomarse en cuenta que los recubrimientos son capaces de disminuir la pérdida de agua, debido a que forman una barrera lipídica en la epidermis del fruto. Se observó que la efectividad fue mayor con el recubrimiento semperfresh, lo que sugiere una mayor adherencia a la superficie del fruto.

Carranza en 2017 aplicó un recubrimiento con base en carnauba en tomate y obtuvo una pérdida fisiológica de peso de 6.4% al día 8 de análisis. Así, podemos observar que el valor reportado en este estudio se encuentra cercano a los resultados obtenidos por el tratamiento de semperfresh, pero por debajo de lo obtenido en la combinación de este con *Bacillus atrophaeus*.

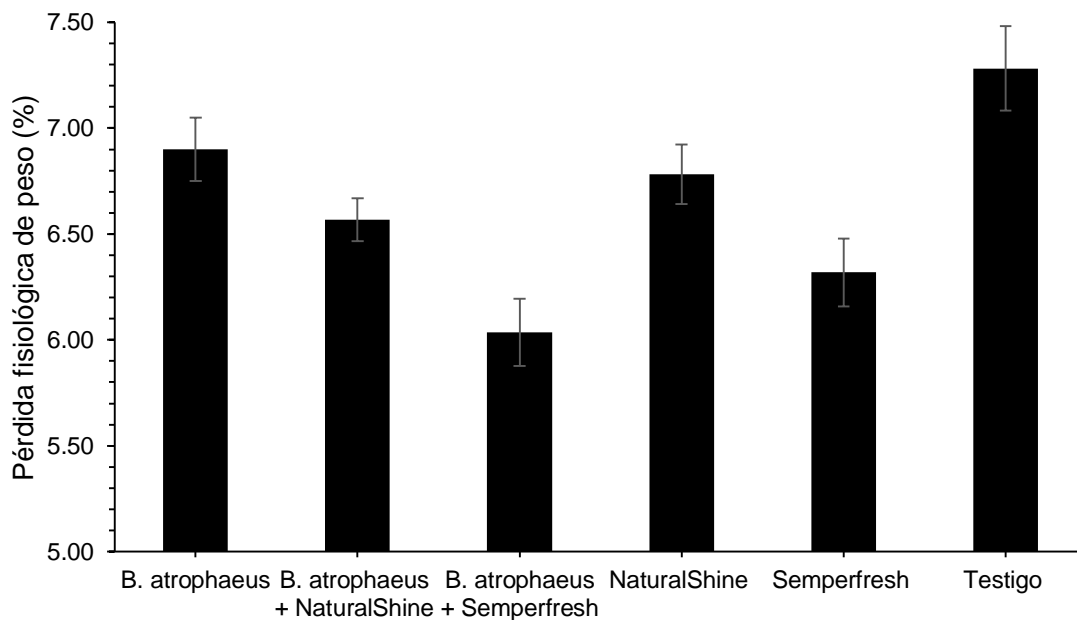


Figura 7.1 Pérdida fisiológica de peso de frutos de tomate al día 8 de almacenamiento.

Se muestra el comportamiento de los frutos testigo y los tratados con *B. atrophaeus*, natural shine, semperfresh y sus respectivas combinaciones.

Como puede observarse, La combinación de semperfresh con *B. atrophaeus*, fue la más efectiva para disminuir la PFP (Figura 7.1). Probablemente la combinación de los metabolitos bacterianos y el recubrimiento ocasionaron una doble capa, o bien puede ser que se haya formado una cubierta de mayor grosor que con los tratamientos por separado, lo que impediría en mayor medida la pérdida de agua del fruto.

7.1.2 Velocidad de producción de etileno (VPE)

La hormona del etileno es una molécula clave en la maduración de los frutos, por ello la determinación del pico de esta hormona es un indicador del comportamiento del proceso de maduración del fruto. En la Figura 7.2A se muestra el patrón de producción de etileno cuando se aplicaron los tratamientos en solitario. Se observa que hubo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la VPE de los frutos de tomate solo en el tratamiento con semperfresh. La máxima VPE se observó el día 3 (8.45-10.12 $\mu\text{l}/\text{kg}\cdot\text{h}$) de almacenamiento para los frutos de tomate testigo y los tratados con natural shine y *B. atrophaeus* sin diferencias significativas. Los frutos tratados con semperfresh presentaron un retraso del máximo pico del etileno de hasta 3 días con respecto a los otros tratamientos, además que este tratamiento tuvo la menor producción de la hormona (5.71 $\mu\text{l}/\text{kg}\cdot\text{h}$, al día 6). Este resultado se atribuye a que el recubrimiento semperfresh puede crear una modificación de la atmósfera interna, como resultado de la formación de una película semipermeable en la superficie del fruto, lo que reduce el oxígeno disponible para el tejido vegetal (Robles-Sánchez y cols., 2013). Se ha demostrado que la enzima formadora del etileno (ACC oxidasa) requiere de oxígeno para convertir el precursor del etileno (ácido 1-aminocilopropano-1-carboxílico) (Blankeship; Dole, 2003); por lo tanto, se puede asumir que si se disminuye el intercambio de oxígeno en el fruto por el recubrimiento se indujo a reducir la producción de etileno. La maduración y el ablandamiento de los frutos climatéricos como el tomate son regulados por la biosíntesis de etileno endógeno (Bennett y Labavitch, 2008). Esta hormona regula la expresión de genes que codifican para varias enzimas responsables del proceso de maduración de los frutos, entre ellas las que degradan la pared celular dando lugar al ablandamiento y por lo tanto afectando la calidad poscosecha del fruto (Eskin y Hoehn, 2013).

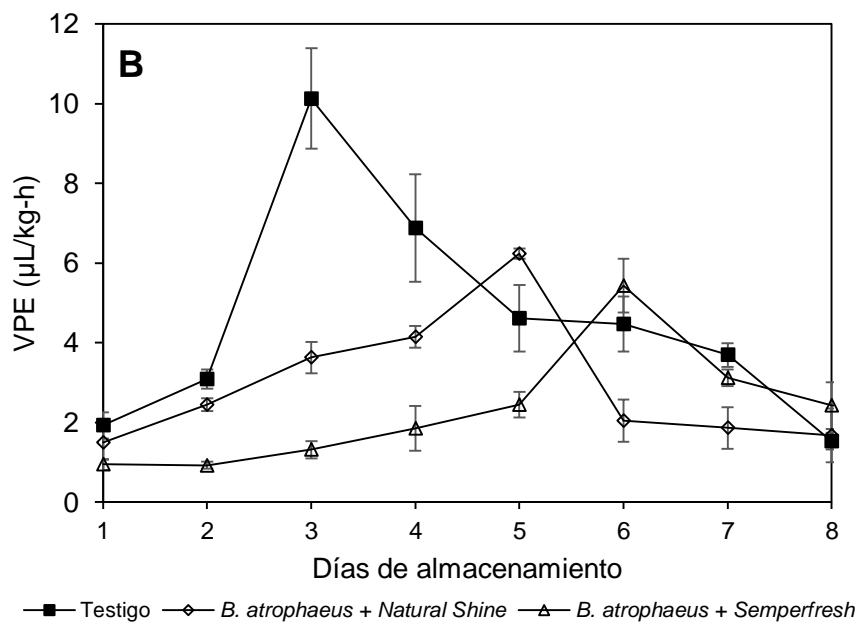
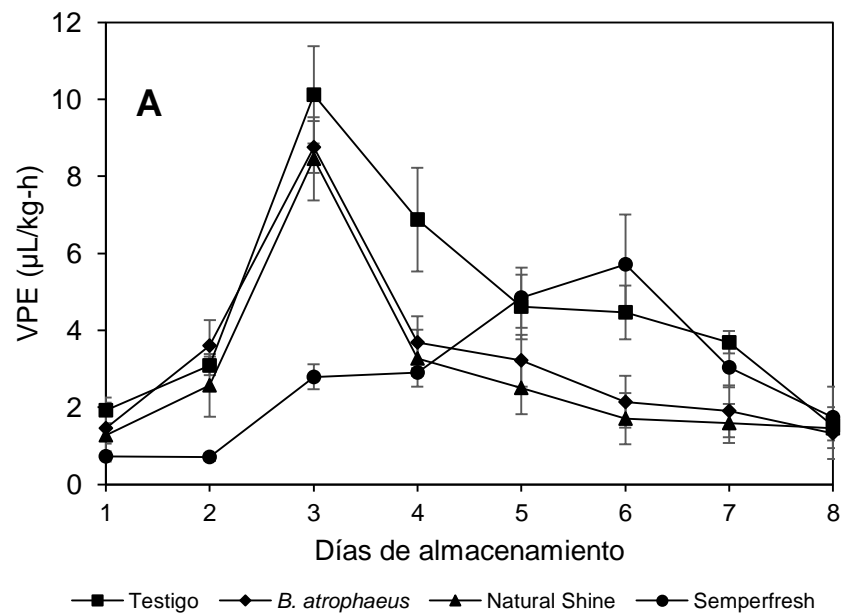


Figura 7. 2 Velocidad de producción de etileno (VPE) de frutos de tomate testigo y tratados.

Bacillus atrophaeus, natural shine y semperfresh (A); los tratamientos en combinación de *B. atrophaeus* + natural shine y *B. atrophaeus* + semperfresh (B).

En la Figura 7.2B se muestra el comportamiento del patrón de producción de etileno cuando se hicieron las combinaciones de *B. atrophaeus* con los recubrimientos. Se puede observar que con los tratamientos combinados se obtuvo un mejor efecto para retrasar la VPE de tomate. Cuando se aplicó *B. atrophaeus* más el recubrimiento natural shine en tomate, se logró disminuir y retrasar el pico de etileno por 2 días; mientras que en la combinación de *B. atrophaeus* con semperfresh se logró disminuir con una mayor efectividad, retrasando el máximo valor de la hormona por 3 días. Esta disminución en el pico de etileno puede ser posible debido a que el recubrimiento forma una película que disminuye el intercambio gaseoso y el incremento del efecto al combinarse con *B. atrophaeus* podría ser porque algunos metabolitos que genera la bacteria pudieran tener un efecto inhibitorio en la percepción del etileno, estos metabolitos al combinarse con el recubrimiento tendrían mayor estabilidad generando un mayor efecto; por lo tanto, la combinación del recubrimiento con la bacteria causa un efecto aditivo en la inhibición de la biosíntesis del etileno.

7.1.3 Velocidad de respiración (VR) en frutos de tomate.

La velocidad de respiración es un parámetro muy importante ya que puede indicar cuanto ha madurado el fruto, esto debido a que utiliza azúcares y ácidos orgánicos de reserva presentes en las vacuolas de las células (los cuales son cambios fisiológicos inducidos por el etileno) para aumentar su efecto en el fruto, el cual provoca una maduración más rápida (Berbesí y cols., 2006).

En la figura 7.3A se observa que hubo efecto significativo de los tratamientos en la VR de los frutos de tomate. Los frutos testigo presentaron el pico respiratorio el día 3 de almacenamiento con 31.47 mL CO₂/kg-h. Además, se compara los resultados de los tratamientos en solitario y el testigo, se observa que tanto natural shine como *Bacillus atrophaeus* por sí solos presentan una disminución del pico respiratorio, sin embargo, no consiguen retrasar este parámetro en el tiempo. En contraste, semperfresh por sí solo disminuye en gran medida el pico hasta en 3 días en

comparación con el resto de tratamientos, por lo que asumimos que bajo este tratamiento la maduración de los frutos se ve disminuida. Bajo el tratamiento con semperfresh se plantea que los frutos de tomate retrasan en su maduración en mayor medida debido a que disminuye el intercambio gaseoso en el fruto por medio de una capa semipermeable (Robles-Sánchez y cols., 2013), lo cual trae consigo una inhibición del oxígeno interno, impidiendo la acción del precursor directo del etileno (ACC oxidasa), evitando así que el principal estimulante de la maduración se forme.

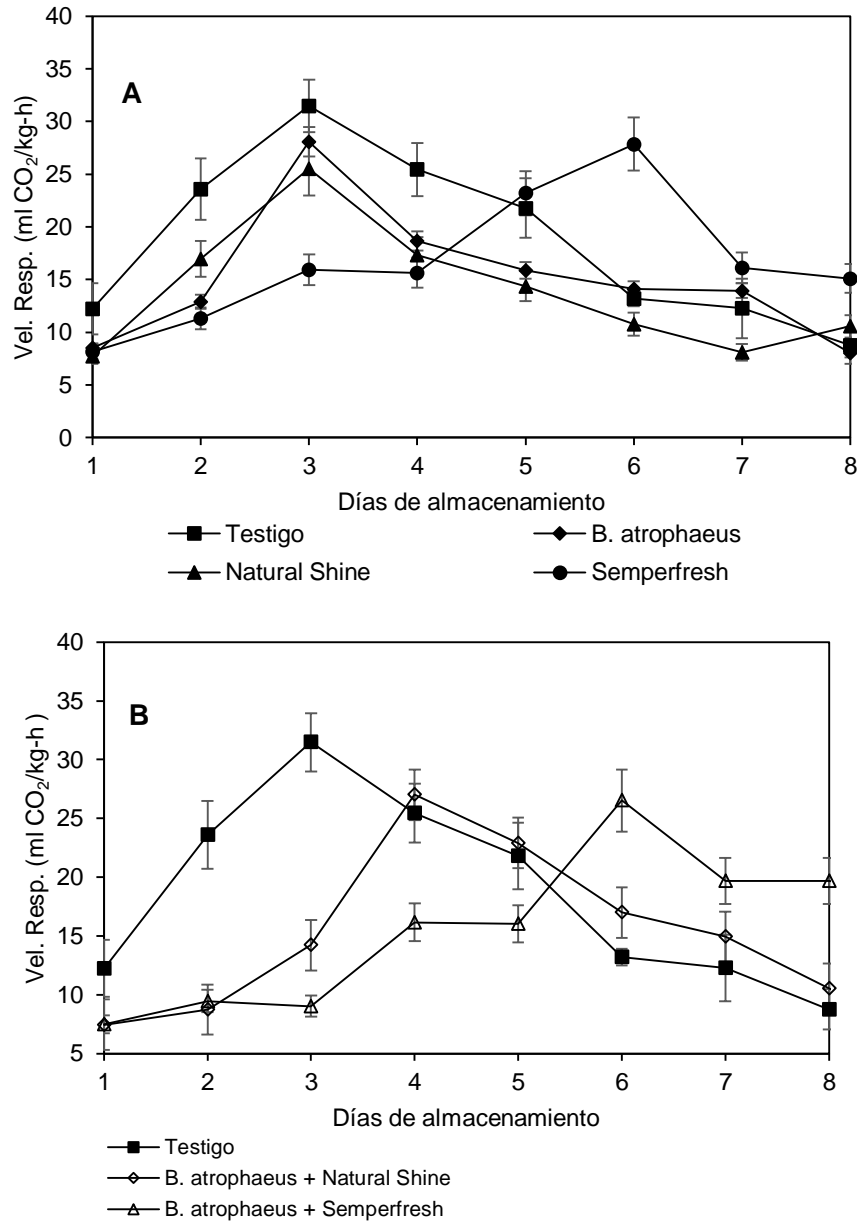


Figura 7.3 Velocidad de respiración (VR) de frutos de tomate testigo y tratados.

B. atrophaeus, natural shine y semperfresh (A), o la combinación de *B. atrophaeus* + natural shine y *B. atrophaeus* + semperfresh (B).

En la Figura 7.3B se comparan los 2 tratamientos combinados, observándose claras diferencias, aunque la combinación de la bacteria *Bacillus atrophaeus* con Natural shine logra retardar el pico climaterico por 1 día, la combinación con semperfresh es más efectiva, logrando retardar el máximo de CO₂ por 3 días con respecto al testigo, lo que se traduce en una disminución de la velocidad de maduración. Si

bien, semperfresh y la combinación de semperfresh con *Bacillus atrophaeus* alcanzan el pico respiratorio el mismo día, se destaca que el tratamiento combinado disminuye la tasa de respiración en los días previos a alcanzar el máximo valor, lo cual sugiere que el metabolismo del fruto se lleva a cabo de manera más lenta, traduciéndose en la extensión de su vida de anaquel. Como se mencionó antes, se asume que esto ocurre porque se disminuyó el intercambio de oxígeno en el fruto debido a que el recubrimiento combinado con la bacteria formó una doble capa o capa de mayor grosor y se redujo la velocidad de respiración, causando una maduración más lenta.

Carranza en 2017, reporta un valor de 27.21 en la concentración de CO₂, observando una disminución de la respiración de su tratamiento a base de carnauba con respecto al control, de manera similar a lo que se presenta en este proyecto.

Para corroborar que la disminución de etileno efectivamente está involucrada en la actividad de enzimas relacionadas con el ablandamiento del fruto, se llevó a cabo la medición de la actividad de la PME y β -gal, para verificar la relación de la actividad de estas enzimas con la producción de esta hormona.

7.2 Evaluación de las enzimas pectinolíticas PME y β -gal.

7.2.1 Actividad de la pectinmetilesterasa (PME).

La PME es una de las principales enzimas causantes de la degradación de la pared celular, esta enzima es regulada por el etileno, ya que esta hormona activa la transcripción del gen que codifica para la PME. Al incrementar la actividad de esta enzima se produce la degradación de la pared celular dando lugar al ablandamiento del fruto durante la maduración (Eskin y Hoehn, 2013). Este ablandamiento hasta cierto punto es deseable, sin embargo, cuando es excesivo se traduce en una disminución de la calidad poscosecha del fruto.

Los resultados mostrados previamente de concentración de etileno y CO₂ (figuras 7.2 y 7.3) corresponden con la actividad de la PME. En la Figura 7.4 A y B se puede

observar que en los frutos testigo hay una mayor actividad de la enzima pectinmetilesterasa. Con respecto a los tratamientos bajo estudio, si bien natural shine y *Bacillus atrophaeus* muestran diferencias significativas con respecto al testigo es el tratamiento semperfresh donde se puede apreciar una disminución más notoria de la actividad de la PME (Figura 7.3). Se puede inferir que los frutos con una menor actividad de PME son frutos más firmes a consecuencia de una disminución en el proceso de maduración evidenciado por los resultados de la producción de etileno, con lo cual se complementa el resultado de la prueba anterior donde por acción de la capa generada por semperfresh se ve reducida la producción de etileno debido a la disminución del oxígeno interno del fruto, impidiendo que actúe la ACC oxidasa (Blankeship; Dole, 2003).

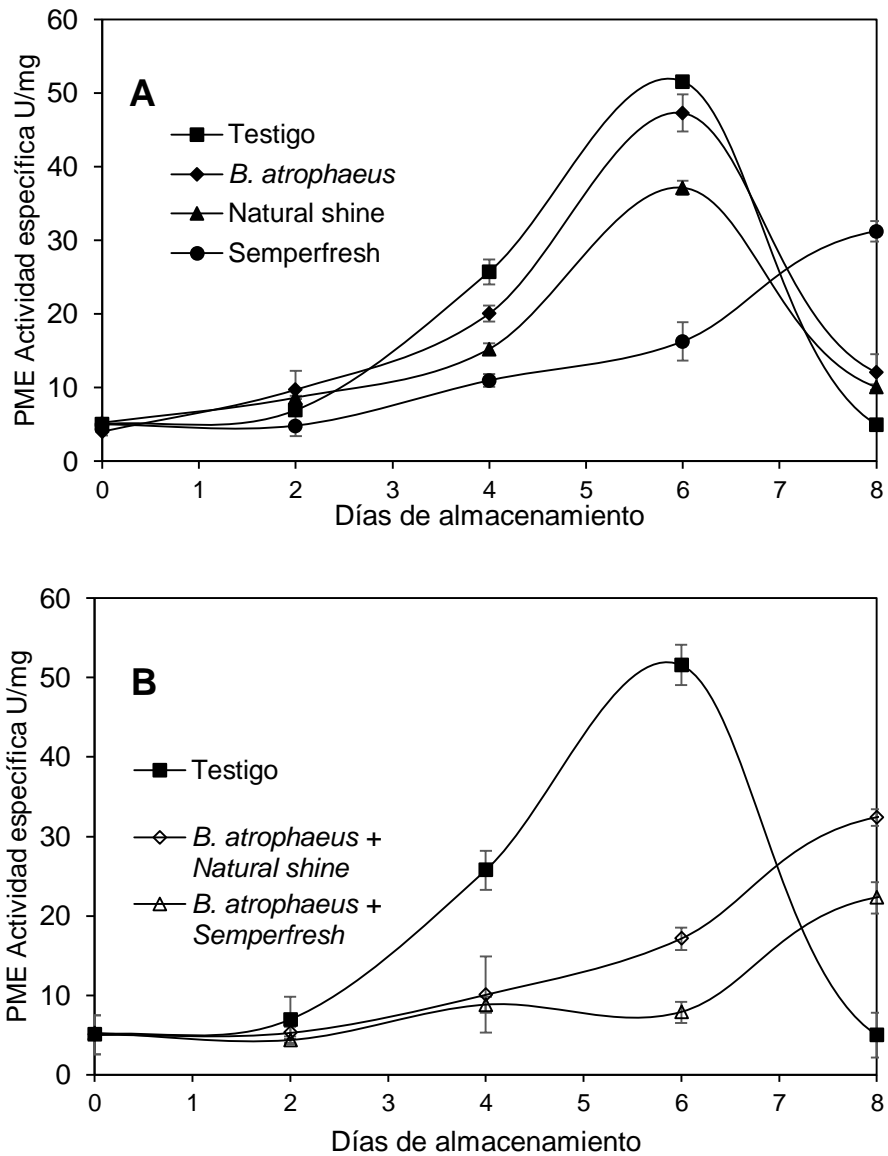


Figura 7. 4 Parámetro de la actividad de la PME de frutos de tomate testigo y tratados.

B. atrophaeus, natural shine y semperfresh (A), o la combinación de *B. atrophaeus* + natural shine y *B. atrophaeus* + semperfresh (B).

En la Figura 7.4B se observa que el tratamiento combinado de *Bacillus atrophaeus* y natural shine presenta una reducción significativa de la actividad de la PME sin embargo se puede observar que la combinación más efectiva es la de semperfresh con la bacteria, donde se logra una mayor efectividad. La aplicación de la combinación bacteria-semperfresh disminuyó notoriamente la actividad enzimática

de la PME en el fruto. Con lo cual nuevamente se interpreta que al ser reducida la concentración de etileno, la activación y actividad de esta enzima se ve afectada. Lo anterior puede deberse a una disminución en la concentración de la enzima desde su biosíntesis, ya que al disminuir la concentración de etileno, la transcripción del gen que codifica para la enzima se hace menos eficiente. Palomeque en 2012, reportó una disminución enzimática al aplicar rizobacterias en tomate, obteniendo una actividad específica de aproximadamente 40 U/mg, valores que se encuentran por encima de la actividad reportada en *B. atropurpureus* + semperfresh.

7.2.2 Actividad de β -galactosidasa

La β -galactosidasa es otra enzima pectinolítica de gran importancia en el proceso de maduración del fruto que también es inducida por el etileno. Esta enzima tiene gran influencia en la degradación de la pared celular del fruto, por cual se espera que al reducir la producción de etileno endógeno, se impacte negativamente sobre la actividad de esta enzima.

De manera similar que los resultados de la PME, en las pruebas de la β -galactosidasa en la Figura 7.5A se observan diferencias significativas tanto de natural shine como *Bacillus atropurpureus* por sí solos con respecto al testigo, sin embargo es semperfresh el que logra reducir la actividad de esta enzima en mayor medida, esto se estaría logrando al disminuir la concentración de etileno, el cual provoca una serie de reacciones que desencadenan en la activación de enzimas pectinolíticas (Reid, 1985; Kader, 1992). Debido a su estructura lipídica semperfresh produce una capa de menor permeabilidad que la de natural shine por lo cual es más efectiva y como ya se mencionó anteriormente provoca una disminución del intercambio gaseoso e inhibe la acción de la ACC oxidasa y con esto la formación del etileno (Blankenship; Dole, 2003).

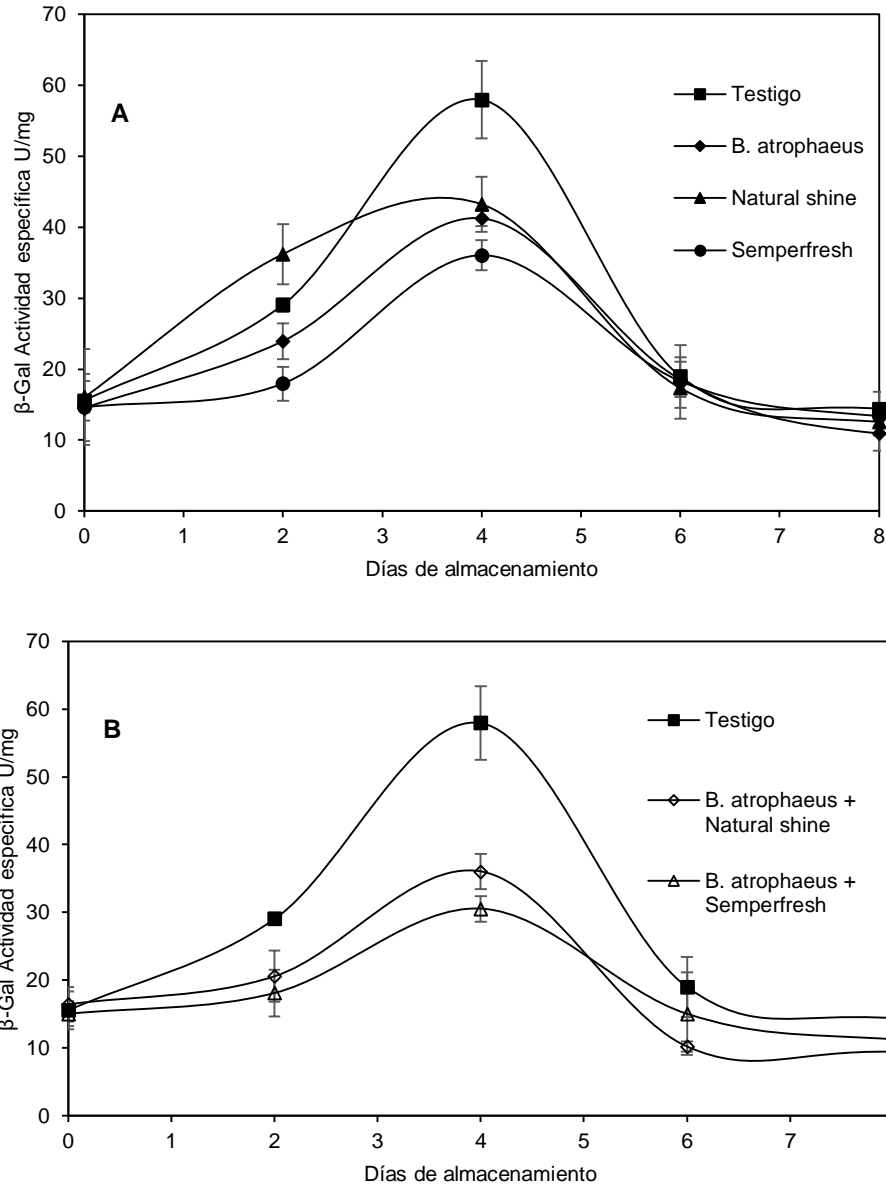


Figura 7.5 . Parámetro de la actividad de la β -gal de frutos de tomate testigo y tratados.

B. atrophaeus, natural shine y semperfresh (A), o la combinación de *B. atrophaeus* + natural shine y *B. atrophaeus* + semperfresh (B).

En la Figura 7.5B se compara la actividad enzimática de los tratamientos combinados y el testigo, mostrando notables diferencias a favor de las combinaciones, teniendo una actividad muy baja en comparación del testigo, si bien el tratamiento de la bacteria combinado con natural shine logra reducir la actividad de la β –galactosidasa, es al combinarse con semperfresh donde se obtiene mayor

efectividad, esto debido a que se está disminuyendo el intercambio de oxígeno en el fruto por la capa que se formó, reduciendo la producción de etileno al impedir que actué la enzima formadora del etileno (ACC oxidasa), la cual requiere de oxígeno para convertir a su precursor directo (ACC) (Blankeship; Dole, 2003).

Palomeque (2012), reporta que sus frutos control presentan una mayor actividad enzimática, del mismo modo que se presenta en este trabajo.

Como el ablandamiento de los frutos está relacionado con la actividad de las enzimas pectinolíticas, resultó obligado evaluar la firmeza de los frutos para experimentalmente tener una correlación de estos dos parámetros. A continuación, se muestran los resultados de esta evaluación bajo los diferentes tratamientos.

7.2.3 Determinación de firmeza en frutos de tomate.

Como se ha venido mencionando, la firmeza del fruto se ve afectada principalmente por la actividad de las enzimas pectinolíticas, al evaluar estas enzimas bajo los diferentes tratamientos se observó que todos estos, en menor o mayor grado, tanto en solitario como en combinación, tuvieron un efecto significativo en la disminución de la actividad de las enzimas estudiadas (Figuras 7.4 y 7.5), por lo que se esperaba que los tratamientos también tuvieran un efecto en la textura del fruto.

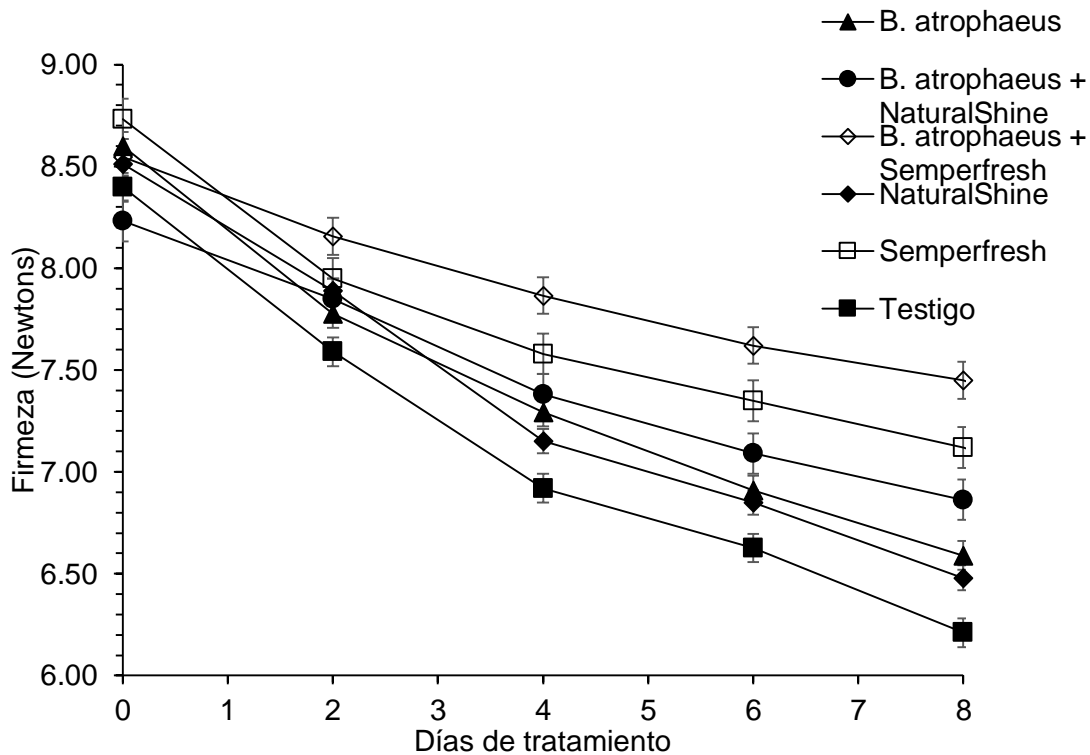


Figura 7.6 Parámetro de firmeza en frutos de tomate testigo y tratados solos o en combinación.

En la Figura 7.6 se observa un descenso muy marcado de la firmeza en los frutos testigo, siendo esto quienes mayor pérdida de este valor muestran, si bien tanto *B. atropurpureus* como natural shine por si solos muestran diferencias significativas con respecto al testigo, es semperfresh quien presenta una mayor efectividad a la hora de mantener la firmeza del fruto, lo cual indica que se estaría disminuyendo en mayor medida la actividad de las enzimas que degradan la pared celular y que provocan cambios fisiológicos en los frutos, conservando así una mayor consistencia aun en el último día de análisis, cabe señalar que este efecto se ve incrementado cuando se combina semperfresh con *B. atropurpureus*, ya que denota una mayor efectividad sobre el retraso de la maduración, esto corresponde a todos los resultados anteriores, los cuales derivan en la conservación de la firmeza del fruto y con ello una extensión de la vida de anaquel, lográndolo por medio de la inhibición de etileno, al impedir la acción de su precursor directo a causa de la efectividad que semperfresh y *B. atropurpureus* consigue con su doble capa que

disminuye el oxígeno interno (Blankeship; Dole, 2003), esto conlleva a una reducción de la actividad de las enzimas pectinolíticas (Bennett y Labavitch, 2008), reduciendo así el efecto degradativo que estas tienen sobre la pared celular.

De acuerdo a lo indicado por Cantwell (2004), quien realiza una clasificación del tomate, indica que la firmeza, en función de la resistencia al corte, puede variar desde valores inferiores a 8 N en tomates muy blandos hasta superiores de 25 N, en tomates muy firmes, también señala que los tomates en estado de madurez fisiológica rondan los 11 N variando un poco según la variedad de tomate. Los resultados obtenidos se aproximan a lo anteriormente reportado, comenzando con alrededor de 9 N al día 0 de almacenamiento y conforme transcurre el proceso de maduración en la pared celular del fruto ocurre un ablandamiento de los tejidos del fruto debido a la acción de las enzimas pectinolíticas, la cual se estaría disminuyendo.

Todo lo anterior complementa a los resultados de análisis realizados previamente, donde se observó una disminución de la actividad de enzimas pectinolíticas (PME y β -gal), lo cual coincide con una menor concentración del principal estimulante de la maduración, el etileno, es por esto que se estaría teniendo resultados favorables sobre el retraso de la maduración ya que como antes se describió, la producción de esta hormona se ve bloqueada debido al recubrimiento que se está formando, el cual le impide ser sintetizado y realizar su funciones como catalizador de la maduración.

Finalmente, para correlacionar el proceso de maduración entre la respiración y producción de etileno, la actividad enzimática y los parámetros de calidad del fruto, se evaluaron diferentes parámetros fisicoquímicos. Los resultados de estos parámetros se muestran a continuación.

7.3 Parámetros fisicoquímicos

El etileno es una hormona clave en el proceso de maduración de los frutos, no solo regula la producción de enzimas relacionadas con el ablandamiento del epicarpio del fruto sino que también es un regulador positivo de otras muchas enzimas que participan en la maduración, como las enzimas responsables de la aparición de aroma y color característico de los frutos al madurar, de las enzimas que provocan cambios fisiológicos que van a dar lugar al incremento de azúcares y reducción de ácidos orgánicos que se involucran en diferentes rutas metabólicas. Es por ello que resulta interesante después de haber evaluado el comportamiento de la producción de etileno bajo los diferentes tratamientos en estudio, evaluar los parámetros fisicoquímicos y establecer su relación con el proceso de maduración del fruto. Para esto se evaluaron parámetros de sólidos solubles totales, pH, y acidez titulable. En el cuadro 7.1 se resumen los valores obtenidos.

Cuadro 7. 1 Parámetros fisicoquímicos (SST, pH y acidez titulable) en frutos de tomate testigo y tratados solos o en combinación.

| Días | Tratamiento | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | T | BA | NS | SF | BA+NS | BA+SF |
| Sólidos solubles totales (°Brix) | | | | | | |
| 0 | 3.85 ± 0.02 cA | 3.75 ± 0.02 bA | 3.75 ± 0.02 bA | 3.67 ± 0.01 abA | 3.75 ± 0.02 bA | 3.65 ± 0.02 aA |
| 2 | 4.37 ± 0.05 cdB | 4.25 ± 0.02 bB | 4.31 ± 0.09 bcB | 4.08 ± 0.07 aB | 4.23 ± 0.05 bB | 4.01 ± 0.05 aB |
| 4 | 4.65 ± 0.02 dC | 4.45 ± 0.02 cC | 4.51 ± 0.05 cC | 4.23 ± 0.03 bC | 4.37 ± 0.01 cC | 4.11 ± 0.05 aC |
| 6 | 4.85 ± 0.02 dD | 4.67 ± 0.01 cD | 4.73 ± 0.03 cD | 4.35 ± 0.02 bD | 4.55 ± 0.02 cD | 4.18 ± 0.07 aCD |
| 8 | 5.07 ± 0.05 dE | 4.91 ± 0.05 cE | 4.93 ± 0.02 cE | 4.51 ± 0.05 bE | 4.72 ± 0.07 cE | 4.31 ± 0.09 aD |
| Potencial de Hidrógeno (pH) | | | | | | |
| 0 | 4.18 ± 0.01 dA | 4.17 ± 0.02 dcA | 4.15 ± 0.03 cA | 4.13 ± 0.02 baA | 4.16 ± 0.02 dcA | 4.11 ± 0.01 aA |
| 2 | 4.36 ± 0.02 dB | 4.32 ± 0.03 cbB | 4.33 ± 0.02 cbB | 4.28 ± 0.01 bcB | 4.31 ± 0.02 bB | 4.26 ± 0.02 aB |
| 4 | 4.52 ± 0.01 eC | 4.48 ± 0.01 dC | 4.48 ± 0.01 cC | 4.44 ± 0.02 bcC | 4.45 ± 0.01 cbC | 4.39 ± 0.01 aC |
| 6 | 4.63 ± 0.01 eD | 4.58 ± 0.01 cD | 4.58 ± 0.01 cD | 4.52 ± 0.01 bD | 4.54 ± 0.01 bD | 4.47 ± 0.02 aD |
| 8 | 4.75 ± 0.02 eE | 4.69 ± 0.01 dE | 4.68 ± 0.02 dE | 4.59 ± 0.01 bE | 4.63 ± 0.01 cE | 4.53 ± 0.01 aE |
| Acidez titulable (% ácido cítrico) | | | | | | |
| 0 | 0.36 ± 0.01 cbA | 0.36 ± 0.02 aA | 0.35 ± 0.01 cbA | 0.35 ± 0.02 cbA | 0.36 ± 0.02 aA | 0.35 ± 0.01 bcA |
| 2 | 0.31 ± 0.02 aB | 0.33 ± 0.01 bB | 0.32 ± 0.01 cbB | 0.33 ± 0.02 cdB | 0.33 ± 0.01 cdB | 0.34 ± 0.01 deB |
| 4 | 0.24 ± 0.01 aC | 0.26 ± 0.02 cC | 0.26 ± 0.02 bcC | 0.29 ± 0.01 dC | 0.28 ± 0.01 dC | 0.31 ± 0.02 cC |
| 6 | 0.19 ± 0.01 aD | 0.22 ± 0.01 bcD | 0.23 ± 0.01 bcD | 0.26 ± 0.02 eD | 0.25 ± 0.02 deD | 0.28 ± 0.01 fDE |
| 8 | 0.16 ± 0.01 aE | 0.18 ± 0.01 bE | 0.19 ± 0.01 bcE | 0.23 ± 0.01 eE | 0.21 ± 0.01 dE | 0.25 ± 0.01 fE |

Los valores son la media ± Desviación estándar (n=3). Letras minúsculas distintas en las filas, indica diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Letras mayúsculas distintas por columna indica diferencias significativas por tratamientos.

En el cuadro 7.1 se observan los resultados de los análisis fisicoquímicos. identificándose los frutos testigo como aquellos que presentaron un mayor contenido de sólidos solubles totales (obteniéndose mayor cantidad de carbohidratos debido a la degradación de almidones lo que se traduce en un incremento de los azúcares en el fruto), también se puede ver que tienen un pH más alto y un descenso notorio de la acidez, de acuerdo con Berbesí y cols., (2006) esto es debido a que los ácidos orgánicos de reserva presentes en las vacuolas de las células, son transformados durante el proceso de maduración por la propia célula a azúcares que son utilizados para la respiración, lo que ocasiona una disminución de la acidez del medio y con ello un aumento del pH), lo cual indica que su maduración está siendo alcanzada más rápidamente que el resto de los frutos.

Los resultados obtenidos en frutos testigo coinciden por lo reportado por Ramírez y cols., (2004), en su estudio acerca de la influencia de la temperatura sobre procesos fisiológicos en poscosecha de tomate, determinaron un contenido promedio de sólidos solubles durante el almacenamiento de este producto entre 3,8 y 4,5 °Brix. Cantwell en 2004, indicó que el contenido de sólidos solubles de los tomates en general, se sitúa entre 3,5 y 7,0 °Brix, dependiendo de la variedad. Carranza en 2017 utilizó una emulsión de aceite agua (la cual contenía carnauba) como recubrimiento para la conservación de tomate y reportó un valor de grados Brix en sus muestras de 4.5 a 4.9, valores que se encuentran por encima de lo que aquí se reporta.

Reina en 1998, observó fluctuaciones con una tendencia descendente, al conservar el producto en condiciones ambientales (28°C y 65% HR). Arana y cols., (2007) consideran que los tomates que presentan características óptimas en cuanto a sabor y aroma, poseen un pH entre 4 y 5. valores en los cuales se encuentran los frutos testigo. Carranza en 2017, reportó un valor de 4.3 de pH y un porcentaje de acidez (reportado como % de ácido cítrico) de 0.39 a 0.34. Los cuales se encuentran en mayor cantidad que lo que se muestra en este trabajo.

En los frutos tratados con *B. atrophaeus* y natural shine se muestran diferencias significativas con respecto al testigo, obteniéndose resultados más efectivos cuando se combinan. Sin embargo, el único tratamiento que por sí solo mostró mayor diferencia significativa es semperfresh, incluso resulta más efectiva que la combinación de la bacteria y natural shine. Este efecto se ve incrementado cuando se realiza la combinación de semperfresh con *B. atrophaeus*, el cual es el tratamiento más efectivo para el retardamiento de la maduración de los frutos de tomate analizados.

Interpretándose que en el caso de los sólidos solubles totales los frutos testigo alcanzaron al día 8 de análisis un valor de °Bx de 5.07 mientras que la combinación de *B. atrophaeus* y semperfresh permaneció en 4.31 °Bx, de manera similar pero en el parámetro de pH al día 8, el tratamiento combinado alcanza un valor de 4.53, el cual es claramente diferente al obtenido en el testigo de 4.75, así mismo pero en

acidez titulable BA+SF mantuvo su porcentaje de ácido cítrico en 0.25 mientras que el tratamiento testigo descendió hasta 0.16.

En general se estaría reduciendo el efecto de estos parámetros fisicoquímicos debido a la inhibición del etileno que como ya se mencionó es el principal estimulante de la maduración, este se ve bloqueado, en mayor medida con la combinación del recubrimiento semperfresh y *Bacillus atrophaeus*, ya que forma una doble capa que disminuye el oxígeno interno que necesita la ACC oxidasa para formar a la hormona catalizadora de la maduración (Blankeship; Dole, 2003).

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

Se obtuvo un retraso en los patrones de respiración y producción de etileno como efecto de los tratamientos empleados.

Los tratamientos aplicados atenuaron la actividad de las enzimas pectinolíticas pectinmetilesterasa y β -galactosidasa, siendo el tratamiento de *B. atrophaeus* con semperfresh el más efectivo.

Los valores de los parámetros fisicoquímicos mostraron diferencia significativa con respecto al control en todos los tratamientos (*B. atrophaeus*, natural shine y semperfresh), pero la mayor diferencia se dio al combinar la bacteria con los recubrimientos, siendo la combinación de esta con semperfresh el tratamiento más efectivo para retrasar la maduración

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

Adalid, A. 2011. Mejora de la Calidad Nutritiva del Tomate: Búsqueda de Fuentes de Variabilidad, Estudio de la Influencia del Ambiente y Determinación del Control Genético. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Aldape J. 2016. Efecto de la aplicación de hongos micorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre la calidad poscosecha del fruto de guanábana (*Anona muricata*). Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. Tepic, Nay., México.

Alexander, L. and Grierson, D. (2002) Ethylene Biosynthesis and Action in Tomato: A Model for Climacteric Fruit Ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2039-2055.

Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C., Marín, A., Escalona, V. 2009. Manual de Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A, Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofré, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of Sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 159–74.

AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemistry. Official Method of Analysis. Virginia, USA: 16a. Edición.

Arana, I., Jarén, C., Arazuri, S., García-Gembe, M.J., Ursua, A., Riga, P. 2007. Calidad del tomate fresco: técnica de cultivo y variedad.

Artés, F. and Artés, F. 2007. Tratamientos Postrecolección Del Tomate Fresco. Tendencias E Innovaciones (Postharvest Handling of Fresh Tomato. Trends and Innovations), Polytechnic University of Cartagena, Murcia, Spain.

Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, M.A., Islam, M.Z., Shahidullah, S. M., Meon, S. 2009. Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 1247-1252.

Barreiro M, J.A., Sandoval B. A.J. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Editorial Equinoccio. Universidad Simon Bolívar, Caracas. 343 Pp.

Bashan, Y. and L. E. de-Bashan. 2010. How the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth. *Adv. Agron.* 108: 77-136.

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1044-51

Benneth, A. B., y Labavitch, J. M. 2008. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell Wall modifying proteins. *Plant Science*, 175 (1), 130-136.

Berbesí, M., Díaz, R., Guevara, L., Tapia, M. 2006. Calidad higiénica y patógenos asociados con melones mínimamente procesados expendidos en supermercados. Desarrollo de tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados. Simposio Ibero - Americano de Vegetais Frescos Cortados. San Pedro, Brazil. Abril.

Blankeship, A. L.; Hyde, G. M. Using 1-MCP to inhibit the influence of ripening on impact properties of pear and apple tissue. *Postharvest Biology and Technology*, p,1-25, 2003.

Bradford, M. M. (1976) “ A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of de protein utilizing the principle of protein dye binding”. *Anal. Biochem.*

Brownleader M D, Hopkins J, Mobasheri A, Dey P M, Jackson P, Trevan M. 1999. Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta* 210, 668–676.

Cantwell, M. 2004. Fresh Market Tomato. Statewide Uniform Variety Trial Report Field and Postharvest Evaluations, University of California, South San Joaquin Valley, CA.

Carranza, Crystal, (2017). Aplicación de una emulsión aceite en agua (o/w) como recubrimiento comestible para la conservación de jitomate. México. Universidad Autónoma del estado de México.

Casado, J. 2004. Aproximación Cinética, Molecular y Proteómica al Estudio de Podredumbre Apical en Frutos de Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Implicación de Polifenol Oxidasa (PFO) y Enzimas Antioxidantes. Departamento de Agroquímica y Bioquímica Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Alicante, España.

Coronel, J., Castillo, P. 2009. Alternativas de mejora en el manejo postcosecha de tomate riñón cultivado en la provincia de Santa Elena. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

Dadzie, B. K.; Orchard, J. E. 1997. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos.. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia. 76 p.

Del Valle, V., Hernández Muños, P., Guarda, A. y Galotto, M. 2005. Development of a cactasmucilage edible coating (*Opuntia Picus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. Food Chemistry. 9:751 - 756.

Eskin, M. N. A., y Hoehn, E. 2013. Chapter 2- Fruits and vegetables, In Biochemistry of foods edited by N. A. Michael Eskin and Fereidoon Shahidi T. Edition, San Diego. pp.

Flores, H.; Walker, T.; Guimaraes, R.; Pal Bais, H.; Vivanco, J. 2002. Andean root and tuber crops: Underground rainbows. Hortiscience 38: 161–167.

Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 95 7825–7829

García-Aceves, J., Abraham-Juárez. 2012. Efecto de *Bacillus subtilis* en genes relacionados con la maduración del fruto de fresa. Universidad de Guanajuato, Irapuato, Guanajuato.

Gross KC (1982) A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. HortScience 17: 933-934.

Guardado L. 2016. Identificación, caracterización y evaluación de bacterias Rizosféricas para el control de *Colletotrichum sp.* y *Alternaria sp.* Que afectan frutos en etapa postcosecha. Tesis de Maestría en ciencias en alimentos. Instituto tecnológico de tepic. Tepic, nay., México.

Hagerman, A.E.; Austin, P.J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v.34, p.440-444, 1986.

Haji, F. N. P.; Alencar, J. A. D.; Prezotti, L. R. Principais pragas do tomateiro e alternativas de controle. 2003.

Hiwasa K, Y Kinugasa, S Amano, A Hashimoto, R Nakano, A Inaba, Y Kubo (2003) Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. J. Exp. Bot. 54:771-779.

Hugh Douglas. (2009). Semperfresh, la clave para una mayor calidad y vida poscosecha. 2009, Agricoat. Influencia de la temperatura sobre procesos fisiológicos en postcosecha de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Agraria Nueva Época 1, 31-37.

Kader, A. A. Postharvest technology of horticultural crops. 2.ed. California: University of California, 1992. 296p.

Kester, J. y Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: A review. Food Technology. 40:47 - 59.

Khan, M. S., A. Zaidi, and P. A. Wani. 2007. Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. Agron. Sust. Dev. 27: 29-43. doi:10.1051/ agro:2006011.

Krochta, J. y Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: changes and opportunities. *Food Technol.* 51:61 - 72.

Lamúa S. M. 2000. Aplicación del frío en los alimentos. Instituto del frío de Madrid. 1ª edición. AMV Ediciones. 350 pp.

Lapa SV, Reva OM. 2005. Algunas propiedades de las cepas de *Bacillus subtilis* activas contra agentes de descomposición en fresas y frutas. *Mikrobiol Z.* 67: 22–31

Lazan, H.; Selamat, M. K.; Ali, Z. M. β -Galactosidase, polygalacturonase and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, Sweden, v. 95, p. 106-112, 1995.

Lemessa F, Zeller W (2007) Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42:336-344.

León, W.E. 2009. Evaluación Ambiental de la Producción del Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), bajo condiciones protegidas en las Palmas de Gran Canaria, España, mediante la utilización de la metodología del análisis del ciclo de vida (ACV), 2007-2009. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Lester G.E. and Burton B.D. 1986. Relationship of netted muskmelon fruit water loss to postharvest storage life. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 111(5): 727-731.

Lucy, M., E. Reed, and B. R. Glick. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.

Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.

Mena-Violante, H. G., y Olalde-Portugal, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 103-106.

- Moyne, A., Shelby, R., Cleveland, T., Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 622–630.
- Noh, M. J., C. Yam C., L. Borges G., J. J. Zúñiga A. y G. Godoy H. 2014. Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana* 32: 273-281.
- Palomeque, Bernardo. 2012. Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). México, Universidad Juárez del estado de Durango.
- Parish, Edward J.; Terrence L. Boos; Shengrong Li (2002). "The Chemistry of Waxes and Sterols". In Casimir C. Akoh, David B. Min. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biochemistry* (2nd ed.). New York: M. Dekker. p. 103. ISBN 0-8247-0749-4.
- Pressey, R. 1983. B-galactosidase in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 71: 132-135.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W., Xuewen, G., De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin Dproducing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 901–11.
- Ramírez, H y A. Benavides, 2004. Horticultural science and industry in Mexico an overview. *Chronica Horticulturae* 43 (3): 20-25
- Ramos, K., Camarena, E. Miranda, R., Sánchez, T., Villagómez, A. 2010. Perfil sensorial del tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedades Saladette, Uva, Bola y Cherry. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Del 27 al 28 de Mayo. Guanajuato, México.
- Ranwala, A.P., Suemats-u, C. and Matsuda, H. (1992) The role of B-galactosidases in the modification of cell wall components during musk-melon fruit ripening. *Plant phsiol.* 100;1328-1325.
- Reid, M.S. 1985. Ethylene and abscission. *HortScience* 20:45–50.

Reina, C.; Guzmán, J.C.; Sánchez, J. Manejo pos cosecha y evaluación de calidad para tomate (*Lycopersicon Esculetum* Mill) que se comercializa en la ciudad de Neiva. Neiva (Huila). Universidad Sur Colombiana. Facultad de Ingenierías. Ingeniería Agrícola. (1998): 127 p.

Ríos, D., Santos, B., Díaz, D., García, N. 2003. Ensayos de cultivares de tomate de exportación en Tenerife: II. Comportamiento en postcosecha. Agrícola Vergel: Fruticultura, Horticultura, Floricultura 262, 504-511.

Robles-Sánchez R. M., M. A. Rojas-Graü, I. Odriozola-Serrano, G. González-Aguilar and O. Martin-Belloso (2013) Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. LWT-Food Science and Technology 50:240-246.

Rojas-Solís, D., C. E. Hernández-Pacheco, and G. Santoyo. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). Rev. Chapingo Serie Hortic. 22: 45-57. doi:10.5154/r.rchsh.2015.06.009.

Ronquillo, E. 2007. Evaluación del Potencial Antimicrobiano de Películas Comestibles con Aceites Esenciales In Vitro e In Situ.. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., México.

Rupasinghe H., Murr D., Paliyath G., Skog L. Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in 'McIntosh' and 'Delicious' apples. J Hort Sci Biotechnol. 2000;75:271–276

Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. Life Sci. Med. Res. 21: 1-30.

Santillana, N., C. Arellano y D. Zúñiga. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Ecol. Apl. 4: 47-51.

Seymour, G., J. Taylor y G. Tucker (eds.). 1993. Biochemistry of fruit ripening. Chapman and Hall, London.

SIAP. (2012) Base de datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera).

Tanada, S.P. y Grosso, C. 2005. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria anassa* quality) Postharvest Biology and Technology. 36:199 - 208

Tovar B, H S García, M Mata (2001) Physiology of pre-cut mango. I. ACC and ACC oxidase activity of slices subjected to osmotic dehydration. Food Res. Intnatl. 34(2-3):207-215.

Uwe Wolfmeier, Hans Schmidt, Franz-Leo Heinrichs, Georg Michalczyk, Wolfgang Payer, Wolfram Dietsche, Klaus Boehlke, Gerd Hohner, Josef Wildgruber "Waxes" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002. doi:10.1002/14356007.a28_103

Vessey, K. J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-586.

Voltolini, R. (2010). Identificação de genes de bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens de *Bacillus* isolados da região amazônica. Tesis para obtener el grado de Maestría. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, Brasil.

Yang, J., J. W. Kloepper, and C. M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci. 14: 1-4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004.