

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Uso de trealosa y *Lactobacillus plantarum* para la conservación poscosecha de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.var Brewster)”

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I.A. Lizette Liliana Rodríguez Verástegui

DIRECTORA DE LA TESIS:

Dra. Clara Pelayo Zaldívar

ASESORAS:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Dra. Laura J. Pérez Flores

México, D, F., 3 de Agosto del 2011.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha de frutas y hortalizas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Clara Pelayo Zaldívar.

México D.F. a 3 de Agosto del 2011.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Uso de trealosa y *Lactobacillus plantarum* para la conservación poscosecha de litchi (*Litchi chinensis* Sonn. var *Brewster*)”

que presentó

I.A. Lizette Liliana Rodríguez Verástegui

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Clara Pelayo Zaldívar

Asesora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesora: Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Jurado:

Presidente: -----
Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Secretario: -----
Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: -----
Dra. Mónica Ponce Valadez

Vocal: -----
Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Gracias por compartir este sueño conmigo Dra. Clarita por brindarme su amistad, su cariño, su paciencia y compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Keiko Shirai y a la Dra. Laura Pérez por su colaboración, su esfuerzo y disponibilidad para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. José Ramón Verde Calvo, Dr. Fernando Díaz de León, Dr. Héctor Escalona, Dr. Fernando Rivera y Dra. Mónica Ponce por su apoyo, su tiempo, su amistad y su comprensión.

A Dr. Francisco Perrino por ser el español más mexicano y pensar siempre en los alumnos de posgrado.

A Don Dago por ser el animador y el consejero incansable.

A la familia Verástegui Juárez por ser parte de mi vida, por quererme como a una hija y una hermana.

A la familia Carrillo Carranza por su hospitalidad, su amistad y su afecto.

A mis amigos, Juliana, Laura, Víctor, Alejandro, Anabel, Mónica, Ivonne, Dulce, Azalia, Cristina, Josefa, Rosaisela, Leonor, Iván que siempre están cuando se necesita tomar un respiro.

A todo el grupo de trabajo de cada lunes que me ha permitido crecer con sus críticas.

A todos aquellos que de alguna manera han aportado a mi aprendizaje.

A CONACYT por la beca que me otorgó para continuar estudiando.

Y a ti UAMI por ser mi casa abierta.

Porque: "Un sueño que se sueña solo, es sólo un sueño. Un sueño que se sueña con alguien es una realidad." J. Lennon.

Gracias. Lizette Liliána.

DEDICATORIAS

A Guille y Poncho por cumplir con sus deberes como padres, por enseñarme el camino, por dejarme soñar despierta, por darme entusiasmo y confianza. Por la atención y por el apoyo incondicional

POR ENSEÑARME A SER INDEPENDIENTE, POR DEJARME SER Y VIVIR.

A ti David por la confianza, por tu cariño, por tu compañía y complicidad. Te amo hermano.

A mis primos Viridiana, Jessi y Jaime por todos los momentos hermosos que he compartido con ustedes.

A ti Víctor Manuel porque llegaste a mi vida y me has permitido crecer en muchos aspectos de mi persona.

Gracias a la vida por permitirme estar en el lugar adecuado y con la gente adecuada siempre.

Lizette Liliána

3 de Agosto del 2011.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRAC.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. El Litchi (<i>Litchi chinensis</i> Sonn).....	3
2.1.1. Origen, morfología, producción y distribución nacional.....	3
2.1.2. Oscurecimiento del Pericarpio o Cáscara de Litchi.....	4
2.1.3. Oscurecimiento enzimático ocasionado por POD y PPO.....	7
2.2. Lipoperoxidación de Membranas.....	10
2.3. Trealosa (TRA).....	12
2.3.1. Propiedades.....	12
2.3.2. Presencia en organismos anhidrobiontes.....	12
2.3.3. Biosíntesis.....	14
2.3.4. Función.....	15
2.4. Bacterias Ácido Lácticas.....	17
2.4.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> (BAL).....	17
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1. Tecnologías Disponibles para la Conservación de los Frutos de Litchi	19
3.2. Experimento Previo sobre Aplicación de TRA a Frutos de Litchi.....	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
6. HIPÓTESIS.....	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1. Trealosa.....	24
7.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> (BAL).....	24
7.3. Primera Etapa. Efecto de la adición de TRA sobre el crecimiento de la BAL.....	24
7.4. Segunda Etapa. Bioensayo con frutos de litchi.....	24
7.4.1. Material biológico.....	24

7.4.2. Aplicación de la TRA.....	25
7.4.3. Aplicación de BAL sobre la superficie de Litchi.....	25
7.5. Variables de respuesta.....	25
7.5.1. Pérdida de peso.....	25
7.5.2. Índice de daño.....	26
7.5.3. Sólidos solubles totales (SST).....	26
7.5.4. Acidez titulable (AT).....	26
7.5.5. Cociente SST/AT.....	27
7.5.6. Color del pericarpio del litchi.....	27
7.5.7. Antocianinas Totales.....	27
7.5.8. Color del pericarpio del litchi debido a los productos de oxidación.....	28
7.5.9. Lipoperoxidación de membranas.....	29
7.5.10. Determinación de la viabilidad de BAL sobre el pericarpio el fruto.....	29
7.6. Análisis estadístico.....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
8.1. Primera Etapa. Efecto de la adición de TRA sobre el crecimiento de BAL.....	30
8.2. Segunda Etapa. Bioensayo con frutos de litchi.....	31
8.2.1. Pérdida de peso (PP).....	31
8.2.2. Índice de Daño (ID).....	32
8.2.3. Cociente Sólidos Solubles Totales/Acidez Titulable (SST/AT).....	33
8.2.4. Determinación de parámetros de color C* y h.....	35
8.2.5. Antocianinas totales.....	38
8.2.6. Color del pericarpio del litchi debido a los productos de oxidación.....	39
8.2.7. Lipoperoxidación de membranas.....	42
8.2.8. Determinación de la viabilidad de BAL en el pericarpio el fruto.....	43
9. CONCLUSIONES.....	46
10. PERSPECTIVAS.....	48
11. BIBLIOGRAFÍA.....	49
12. APÉNDICE.....	56
13. ANEXOS.....	58

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Producción agrícola de litchi en México en el año 2009 (SIAP, 2009).....	4
Cuadro 2. Características físico-químicas, sensoriales y de digestibilidad de la TRA (Higashiyama, 2002).....	13
Cuadro 3. Síntesis de la TRA mediante el uso de microorganismo transgénicos (Schiraldi et al., 2002).....	14

Índice de Figuras

Figura 1. Reacción de óxido-reducción del peróxido de hidrógeno catalizada por peroxidasas, donde RH_2 corresponde a diferentes sustratos reducidos (glutación, ascorbato, etc.) (Fennema, 2000).....	7
Figura 2. Localización interna y externa de los compuestos fenólicos y las enzimas oxidativas (POD y PPO) en una célula vegetal (Toivonen y Brummell, 2008).....	8
Figura 3. Familia de quinonas, <i>o</i> -benzoquinona (izquierda) y <i>p</i> -benzoquinona (derecha) (Fennema, 2000).....	8
Figura 4. Reacción catalizada por la PPO para generar quinonas (Fennema, 2000).....	9
Figura 5. Mecanismo de peroxidación de los ácidos grasos insaturados (Zenteno et al., 2008).....	11
Figura 6. Cuenta de UFC/mL de <i>L. plantarum</i> en medio MRS a las 36 h de inoculación. La barra es el promedio de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.....	30
Figura 7. Pérdida de peso de litchi 'Brewster' almacenado a $11\pm 1^\circ C$ y $92 \pm 2\%HR$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE.....	32
Figura 8. Índice de daño de litchi 'Brewster' almacenado 21 días a $11\pm 1^\circ C$ y $92 \pm 2\%HR$. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.....	33
Figura 9. Cociente SST/AT de litchi 'Brewster' almacenado a 21 días a $11\pm 1^\circ C$ y $92 \pm 2\%HR$. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.....	34
Figura 10. Interpolación en la esfera de color de los valores iniciales de C^* y h (círculo negro) y de los frutos tratados y control a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento.....	35

Figura 11. Parámetro C* en el pericarpio del litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.....	36
Figura 12. Parámetro h en el pericarpio del litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.....	37
Figura 13. Parámetro L* en el pericarpio del litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa	37
Figura 14. Determinación de antocianinas monoméricas en litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.....	39
Figura 15. Porcentaje de contribución de compuestos poliméricos al color de litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.....	40
Figura 16. Comparación de % compuestos poliméricos y no poliméricos de litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 8 días. AM: antocianinas monoméricas; CP: compuestos poliméricos. Media de 3 repeticiones \pm DE.....	41
Figura 17. Comparación de % compuestos poliméricos y no poliméricos de litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 16 días. AM: antocianinas monoméricas; CP:compuestos poliméricas. Media de 3 repeticiones \pm DE.....	41
Figura 18. Comparación de % de compuestos poliméricos y no poliméricos de litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. AM: antocianinas monoméricas; CP: compuestos poliméricas. Media de 3 repeticiones \pm DE.....	42
Figura 19. Concentración de MDA del litchi ‘Brewster’ almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.....	43

Figura 20. Viabilidad de la BAL en frutos tratados con TRA + BAL y BAL de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.....	45
Figura 21. Crecimiento de Levaduras en frutos de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.....	45
Figura 22. Estructura de la antocianidina.....	56
Figura 23. Estructura de una antocianina.....	57
Figura 24. Cambio estructural de las antocianinas con el cambio de pH.....	57

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BAL.....Bacterias lácticas

TRA.....Trealosa

SO₂.....Dióxido de azufre

PPO.....Polifenol Oxidasa

POD.....Peroxidasa

EROS.....Especies Reactivas de Oxígeno

MDA.....Malondialdehído

FDA.....Food Drug Administration

GRAS.....Alimentos considerados como seguros

PP.....Pérdida de Peso

SST.....Sólidos Solubles Totales

AT.....Acidez Titulable

ID.....Índice de Daño

MRS.....Medio Rogosa Sharpe

UFC / mL....Unidades Formadoras de Colina por mililitro

HR..... Humedad Relativa

DE.....Desviación Estándar

Tg.....Temperatura de transición

b.s.....Base Seca

RESUMEN

El principal problema poscosecha del litchi es el rápido oscurecimiento del pericarpio debido a la degradación de antocianinas y a su polimerización, lo cual ocurre en menos de 48 h cuando el fruto se almacena a temperatura ambiente. Este cambio en la coloración del pericarpio evita su comercialización en mercados internacionales principalmente, sin dejar de lado el mercado nacional.

La pérdida del color rojo puede verse potenciada por las condiciones climáticas durante el desarrollo y cosecha del fruto, el ataque por microorganismos patógenos e insectos y la pérdida de peso debida a la transpiración del fruto. Una vez cosechado, es necesario emplear tecnologías que mantengan el mayor tiempo posible el color rojo brillante característico del pericarpio. El presente estudio evalúa alternativas para la conservación poscosecha de esta característica de calidad, así como para conservar la calidad de la pulpa y extender la vida útil del litchi en beneficio de los productores de este fruto.

La primera propuesta se refiere al uso de *Lactobacillus plantarum* bacteria láctica utilizada ampliamente en la industria alimentaria, debido a su capacidad de acidificar el medio y producir diversos antimicrobianos, lo cual a la par que favorece la forma roja flavilium de las antocianinas controla el crecimiento de algunos microorganismos que se desarrollan en la cáscara de los frutos después de la cosecha y por lo tanto, puede actuar como agente de biocontrol.

La otra alternativa propuesta es el uso de la trealosa (TRA) por su capacidad protectora de las membranas celulares en condiciones de deshidratación y sequedad extrema. Este disacárido se encuentra presente en altas concentraciones en los organismos anhidrobiontes capaces de sobrevivir sin agua y reactivar su metabolismo sin daño alguno una vez que el agua se encuentra disponible. La TRA es empleada en la industria alimentaria y farmacéutica para conservar alimentos y células deshidratadas durante largos periodos de almacenamiento evitando la pérdida de aromas, sabores y la muerte celular (Higashiyama, 2002).

Al inicio del estudio se determinó la concentración de TRA que no afectara adversamente el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* (BAL), para lo cual se cultivó a la BAL en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) adicionado con diferentes concentraciones de TRA (0.18, 2.6, 5, 7.5 y 10% p/v) durante 36 h, observándose que no hubo efecto de ninguna de las

concentraciones probadas en el crecimiento de BAL. Con estos resultados y los obtenidos en el experimento preliminar con litchis en donde se observó un efecto positivo de la TRA al 5% (p/v) en la reducción de los daños de la cáscara y en la conservación de la calidad interna de la pulpa, se decidió emplear esta concentración en los bioensayos sucesivos.

Las BAL fueron aplicadas asperjando sobre los litchis una suspensión celular de 10^7 UFC /mL durante minuto y medio para promover que toda la superficie del fruto quedara impregnada, mientras que la solución de TRA fue aplicada por inmersión de los frutos durante un tiempo de tres minutos.

Los frutos tratados con BAL y la TRA lograron conservar el color expresado como C^* y h y mostraron un menor porcentaje de compuestos poliméricos. Además, se observó una mayor concentración de antocianinas en los litchis tratados con las BAL, efecto que no se observó en los frutos tratados con la TRA pero éstos sí mostraron un cociente SST/AT adecuado para la comercialización.

La combinación de la TRA + BAL no mostró actividad prebiótica ya que no hubo un aumento de la cuenta bacteriana con respecto al tratamiento que solo contenía BAL.

Asimismo, la evaluación de los niveles de lipoperoxidación indicó que la TRA no tuvo efecto protector sobre las membranas del pericarpio de litchi, contrario a lo reportado en otros tejidos vegetales como tabaco y plantas de la resurrección.

Los frutos control mostraron al término del almacenamiento una calidad de pulpa adecuada para la comercialización, indicada por un cociente sólidos solubles totales/ acidez titulable aceptable debido a las condiciones de alta humedad ($92 \pm 2\%$) que se mantuvieron durante el almacenamiento refrigerado ($11 \pm 1^\circ\text{C}$) y a la buena calidad inicial de los frutos.

ABSTRACT

The main postharvest problem in litchi is the rapid darkening of the pericarp due to the degradation and polymerization of anthocyanines, which occurs in less than 48h when the fruit is stored at room temperature. This change of color of the pericarp prevents the fruit's commercialization mainly in international markets, but also in national ones.

The loss of its red color can be more severe due to: climatic conditions during its development and harvest, microbial pathogens and insects that target it, and weight loss from transpiration. Once it has been harvested, it is necessary to employ methods that maintain the characteristic red color of its pericarp for the longest time possible. The present work evaluates methods for preserving this specific postharvest quality parameter, preserve the fruit's pulp quality, and extend its self-life in order to benefit litchi producers.

The first method uses *Lactobacillus plantarum*, a lactic bacteria widely used in the food industry due to its capacity to acidify its medium and produce diverse antimicrobial agents. The latter favors the red flavilium configuration of anthocyanines and simultaneously limits the growth of some microorganisms that develop on the ring of fruits after harvesting; thus acting as a biocontrol agent.

The other method employed trehalose (TRA) because it protects cell membranes against dehydration and extreme desiccation. High concentrations of this disaccharide are normally found in anhydrobiotes capable of surviving without water, and of reactivating their metabolism once water becomes available without suffering any damages. TRA is also used in the food and pharmaceutical industries to preserve foods and dehydrated cells for long periods of storage; preventing the loss of aromas, flavors and cell death (Higashiyama, 2002).

Concentrations of TRA that would not pose adverse effects to *Lactobacillus plantarum* (BAL) growth were initially determined. For this purpose BAL was grown for 36h in Man Rogosa Sharpe (MRS) media with different concentration of TRA (0.18, 2.6, 5, 7.5 y 10% w/v). No detrimental effects on BAL were observed at any of these TRA concentrations. In a prior preliminary litchi study, it was observed that 5% of TRA (w/v) reduced damage to the rind of fruits and had a positive effect on preserving pulp quality. With these results and those from the BAL growth assessment, it was decided that a 5% TRA concentration would be used in the subsequent bioassays.

A 10^7 CFU/ml solution of BALs was sprayed over the litchis for 90 sec to guarantee that the entire surface of the fruits were covered, while the TRA solution was applied via a 3 min immersion.

BAL and TRA treated fruits managed to preserve their color (C^* and h) and had a lower percentage of anthocyanine polymers than non-treated fruits. Also, a higher concentration of anthocyanines was observed in BAL treated litchis, but not in TRA treated ones. However, the latter did show a TSS/TA ratio that would be adequate for their commercialization.

The TRA + BAL combination did not show any prebiotic activity since the bacterial count of this treatment did not increase when compared to the BAL-only treatment.

At the same time, lipoperoxidation levels indicated that TRA did not protect the membranes of the pericarp cells in litchi, contrary to what had been reported in other vegetable tissues such as tobacco and resurrection plants.

Finally, the pulp quality of control fruits was adequate for commercialization at the end of storage, since its ratio of TSS/TA was acceptable due to the high humidity conditions ($92 \pm 2\%$) maintained during refrigerated storage ($11 \pm 1^\circ\text{C}$), and the initial high quality of the fruits.

1. INTRODUCCIÓN

Entre las tecnologías más usadas para mantener la calidad del fruto del litchi se reportan la radiación gamma, tratamientos con agua caliente o fría para activar enzimas de choque térmico que limiten el oscurecimiento del pericarpio, películas como el quitosano, microorganismos como *Lactobacillus plantarum* (Martínez-Castellanos et al., 2011), atmósferas modificadas y controladas, fumigación con dióxido de azufre (SO₂) e inmersión en soluciones ácidas (Sivakumar et al., 2007).

Hasta el momento, el único tratamiento que permite tiempos de almacenamiento prolongados es la fumigación con dióxido de azufre (SO₂) y posteriormente la inmersión en una solución ácida. Este tratamiento permite conservar el color rojo del fruto debido a que el dióxido de azufre (SO₂) forma un complejo con las antocianinas, estabilizándolas, evita el crecimiento de microorganismos y limita la actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO); además se ha reportado que disminuye la pérdida de peso durante el almacenamiento. Sin embargo, dicho tratamiento tiene un impacto negativo sobre la fruta y el medio ambiente. En cuanto a la fruta promueve el agrietamiento y hundimiento de la cáscara y en ocasiones produce con el paso del tiempo, un color rojo oscuro poco atractivo al consumidor. El dióxido de azufre (SO₂) generado durante el tratamiento es liberado a la atmósfera y las soluciones ácidas contaminan el suelo y los mantos acuíferos (Akanime, 1960; Zauberman et al., 1989). Además, el tratamiento con SO₂ está en vías de ser prohibido, ya que el consumo de sulfitos puede ocasionar reacciones alérgicas y enfermedades entre algunos consumidores.

La trealosa (TRA) es un carbohidrato empleado en la deshidratación de alimentos como el huevo y los purés de frutas y es considerada como un ingrediente seguro (GRAS) (Higashiyama, 2002). Aún se tienen hipótesis acerca de su modo de acción, sin embargo se sabe que en plantas de la resurrección, *Selaginella lepidophylla*, en condiciones de deshidratación extrema, evita la muerte celular (Crowe, 2002). En este trabajo se propone que la TRA pudiera mostrar un efecto similar si es aplicada sobre el pericarpio del litchi, evitando la degradación de antocianinas y el oscurecimiento de la cáscara producto de los compuestos polimerizados. Además de que pudiera también tener efecto prebiótico si se pone en contacto con una bacteria benéfica que pueda consumirla.

Lactobacillus plantarum es una bacteria láctica que ha sido empleada para acidificar la superficie de alimentos y evitar el crecimiento de microorganismos oportunistas por la

síntesis de bacteriocinas o por la acidificación del medio, es también considerada GRAS y ha sido probada con diferentes fuentes de carbono (Martínez- Castellanos, 2009). Aún no se ha probado el efecto que tendría el empleo de una fuente de carbono que funcionara como prebiótico para promover la cuenta bacteriana y si es posible la producción de ácido láctico.

El presente trabajo aborda el estudio de los efectos de la TRA sola o en combinación con *Lactobacillus plantarum* en la conservación de litchi 'Brewster'.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)

2.1.1. Origen, morfología, producción y distribución nacional

El litchi es un árbol tropical perteneciente a la familia Sapindaceae, que produce frutos no climatéricos, es originario del sur de China y norte de Vietnam. El fruto difiere en forma, desde cilíndrica hasta esférica, tiene un pericarpio correoso que varía de color dependiendo del estado de madurez (verde, rosa, rojo) y de la variedad (amarillo, rojo) debido a la presencia de antocianinas; contiene una porción comestible, blanca y succulenta, llamada arilo que rodea a una semilla central negra y brillante. La pulpa o arilo contiene 80% de agua, 40 a 90 mg de vitamina C /100g de porción comestible, 0.2 a 1.1% de acidez y de 11.8 a 20.6% de azúcar. Se ha reportado que para la mayoría de las variedades cultivadas la calidad gustativa está determinada por el cociente sólidos solubles totales/acidez titulable, citándose un cociente de 30 a 40 como óptimo para fruta recién cosechada en Australia (Underhill y Wong, 1990) y de 20 a 40 para México (Castillo-Animas y Pelayo-Zaldívar, 2006).

Existen más de 100 variedades de litchi, las cuales se distinguen por sus requerimientos climáticos, la calidad de la fruta, la maduración y el grado de alternancia, entre otras características. Las principales regiones productoras en el mundo se localizan en China, India, Tailandia, Vietnam, Madagascar, Australia, Israel, República de Sudáfrica y Centro y Norte de América (Galán, 1987; Jacuinde, 2007; Martínez-Castellanos, 2009).

En México la variedad más difundida e importante comercialmente es Brewster cuyos frutos son de color rojo brillante; aunque también se han introducido al país 'Mauricio', 'Haak Yip', 'Groff' y 'Seet Cliff'.

La producción anual en México (Cuadro 1) asciende a 15,680.30 ton, los estados que mayor producción tienen son Veracruz, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí (SIAP, 2009).

Cuadro 1. Producción agrícola de litchi en México en el año 2009 (SIAP, 2009).

Ubicación	Sup. Sembrada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)	PMR (\$/ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)	% de Producción
OAXACA	470.00	4,490.00	9.55	26,581.29	119,350.00	39.14
VERACRUZ	1,546.25	4,805.30	3.15	13,913.44	66,858.23	21.92
PUEBLA	220.00	3,460.00	15.73	19,069.36	65,980.00	21.64
SAN LUIS POTOSI	574.09	1,568.28	2.86	16,217.51	25,433.60	8.34
SINALOA	340.00	757.80	2.23	21,824.36	16,538.50	5.42
MICHOACAN	109.75	255.60	3.77	16,116.98	4,119.50	1.35
HIDALGO	53.75	149.88	3.07	21,917.53	3,285.00	1.07
NAYARIT	55.30	153.19	2.77	18,860.64	2,889.26	0.94
BAJA CALIFORNIA SUR	5.50	11.25	2.04	20,533.33	231.00	0.075
MORELOS	6.00	29.00	4.83	7,000.00	203.00	0.066
TOTAL	3,412.64	15,680.30	4.77	19,444.02	304,888.10	99.96

2.1.2. Oscurecimiento del Pericarpio o Cáscara de Litchi

La pérdida de calidad del fruto está estrechamente relacionada con el oscurecimiento de la cáscara ocasionado principalmente por la pérdida de agua, la senescencia, el daño por frío, el cual ocurre a temperaturas de almacenamiento menores de 7°C en la variedad Brewster, el ataque de patógenos e insectos; también se promueve por factores de almacenamiento tales como el tiempo excesivo, la humedad relativa baja y la presencia de oxígeno.

El pericarpio maduro (1-3 mm de espesor) consta de tres capas: a) el epicarpio o exocarpo, formado por una cutícula (1-3 µm), una epidermis uniseriada y un

esclerénquima subepidérmico; b) el mesocarpo un tejido parenquimatoso que contiene clorofila y en el fruto maduro, la mayoría de las antocianinas; y c) el endocarpo que generalmente se separa del arilo cuando la fruta madura (Holcroft y Mitcham, 1996).

El índice de oscurecimiento del fruto se incrementa durante el almacenamiento a temperatura ambiente dentro de los primeros 3 días, mientras que la concentración de antocianinas decrece, por lo que se ha indicado que el índice de oscurecimiento del pericarpio está asociado con la concentración de antocianinas (Zhang et al., 2005). Sin embargo, se ha reportado que el contenido de estos pigmentos sólo decrece 19 % después de 25 días de almacenamiento a 4 °C (Lee y Wiker, 1991) y 18 % en la variedad Brewster al cabo de 21 días a 10 °C (Martínez-Castellanos et al., 2011). Otros investigadores mencionan que el contenido detectado de antocianinas se ve influenciado por el método utilizado para la extracción (Jacques et al., 2005). Zhang et al. (2001) utilizando un método de extracción diferente a la clásica maceración y extracción en medio ácido encontró que el 50% de las antocianinas desaparecían a los 3 días de almacenamiento a 30°C y 70% de humedad relativa.

Las antocianinas son un grupo de compuestos relativamente inestables, en medio ácido tienen su mayor estabilidad. Tanto el tono del pigmento como su estabilidad se ven influenciados por la estructura del aglicón (Veáse apéndice 1). Son moléculas susceptibles al ataque del oxígeno y aunque existe poca información acerca de su estabilidad a determinada actividad de agua (a_w) se ha observado que en un intervalo de 0.63–0.79, muestran mayor estabilidad (Fennema, 2000).

El color rojo de la cáscara de litchi se debe a la presencia de seis antocianinas: cianidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, malvidina-3-acetilglucósido, pelargonidina-3-glucósido y quercetina-3-rutinósido (Jiang et al., 2004). Recientemente, se identificó por HPLC-MS que la antocianina en mayor proporción en la cáscara de litchi 'Brewster' es la cianidina-3-rutinósido y que su vida media a pH 3.5 y 50°C es de 16 h (Rivera- López et al., 1999; Fennema, 2000; Martínez -Castellanos, 2009).

En general se piensa que el oscurecimiento del pericarpio se debe a la rápida degradación de las antocianinas ocasionada por las enzimas polifenol oxidasa EC. 1.14.18.1 (PPO), peroxidasa EC. 1.11.1.7 (POD) y recientemente se ha propuesto que participen otras enzimas llamadas antocianinasas (Zhang et al., 2001; Jiang et al., 2004; Zhang et al., 2005).

La PPO que es también conocida como catecol oxidasa, tirosinasa, catecolasa y *o*-difenol-oxígeno-reductasa tiene dos tipos de actividad catalítica: monofenolasa y *o*-difenolasa.

La actividad monofenolasa (fenol hidrolasa o cresolasa) hidroxila normalmente los sustratos en posición orto y produce fenoles ortohidroxilados o difenoles (Fig. 4), este tipo de actividad se presenta en productos hortifrutícolas como el champiñón (Quirasco, B.M., 2006).

La PPO con actividad *o*-difenolasa (Fig. 4) ha sido aislada y purificada de la cáscara del trigo, la deshidrogenación de los compuestos fenólicos sobre los cuales ejerce su actividad genera *o*-quinonas y la polimerización no enzimática de éstas genera pigmentos de color café llamados melaninas (Dicko et al., 2006).

La PPO se ha aislado de la cáscara del litchi, su pH y temperatura óptima de actividad son 6.5 y 70°C, respectivamente. La enzima puede ser inhibida por antioxidantes como glutatión y L- cisteína, y activada por cationes divalentes como el Mn²⁺ y Ca²⁺. Sin embargo, la PPO no actúa directamente oxidando las antocianinas pues tiene baja afinidad por éstas, pero tiene alta afinidad por los productos de la degradación oxidativa de las antocianinas (Jiang et al., 2004; Jacques et al., 2005).

Por su parte las peroxidases se encuentran distribuidas ampliamente en el reino vegetal y animal. Forman parte del grupo de enzimas llamadas oxido-reductasas; existen grupos de isoenzimas de peroxidases que pueden ser detectadas y separadas por electroforesis. En general estas enzimas son hemoproteínas de aproximadamente 300 aminoácidos que usan el peróxido de hidrógeno como sustrato oxidativo (Fig. 1), aunque se han encontrado otras peroxidases que contienen otros grupos metálicos como el selenio, vanadio o un grupo prostético de flavina. Las peroxidases se localizan principalmente en el citoplasma, las vacuolas y la pared celular; aunque también se han encontrado en el plasmalema, mitocondria, tonoplasto y microsomas.

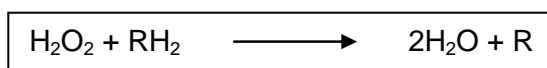


Figura 1. Reacción de óxido-reducción del peróxido de hidrógeno catalizada por peroxidases, donde RH₂ corresponde a diferentes sustratos reducidos (glutatión, ascorbato, etc.) (Fennema, 2000).

Las peroxidasas son enzimas versátiles que pueden catalizar reacciones peroxidativas, oxidativas e hidroxilaciones. Se han implicado en muchos procesos metabólicos tales como el catabolismo de hormonas, la oxidación de fenoles, el entrecruzamiento de los polisacáridos y las proteínas estructurales de la pared celular, la polimerización de la lignina, la maduración de las frutas y la defensa contra patógenos. Durante la maduración de los frutos y particularmente durante el climaterio, se ha encontrado que la actividad de la peroxidasa aumenta a la par de otras enzimas como la polifenol oxidasa (Rivera, 2005).

Las enzimas POD y PPO actúan sinérgicamente, ya que la primera puede generar H_2O_2 durante el curso de la catálisis y la segunda O_2 , ambos productos son inductores de la actividad de estas enzimas, generando *o*-benzoquinonas, pigmentación oscura y malos sabores además de promover reacciones secundarias por su naturaleza electrofílica. Las actividades de POD y PPO se determinan con frecuencia pues se consideran buenos indicadores de la preservación y calidad sensorial de las frutas y hortalizas (Dicko et al., 2006). En la Fig. 2 se puede observar la localización de estas enzimas y sus sustratos.

2.1.3. Oscurecimiento enzimático ocasionado por POD y PPO

La *o*-benzoquinona pertenece a la familia de las quinonas (Fig. 3), compuestos que al oxidarse generan colores que van desde amarillo hasta negro. La *o*-benzoquinona es el producto inicial de la oxidación catalizada por la PPO en presencia de compuestos fenólicos, es una molécula inestable que sufre oxidación no enzimática por el O_2 y una polimerización para dar melaninas (Fig. 4), pigmentos responsables de la coloración indeseable de frutas como el plátano, manzana, pera y deseables en otros como el café, el té y las ciruelas deshidratadas. Esta reacción es responsable del deterioro del color, sabor y calidad nutricional de jugos de vegetales y frutas. El ácido ascórbico, el bisulfito de sodio y los compuestos tiólicos impiden el pardeamiento porque reducen el producto inicial, *o*-benzoquinona, para dar de nuevo el sustrato e impedir la formación de melaninas (Fennema, 2000).

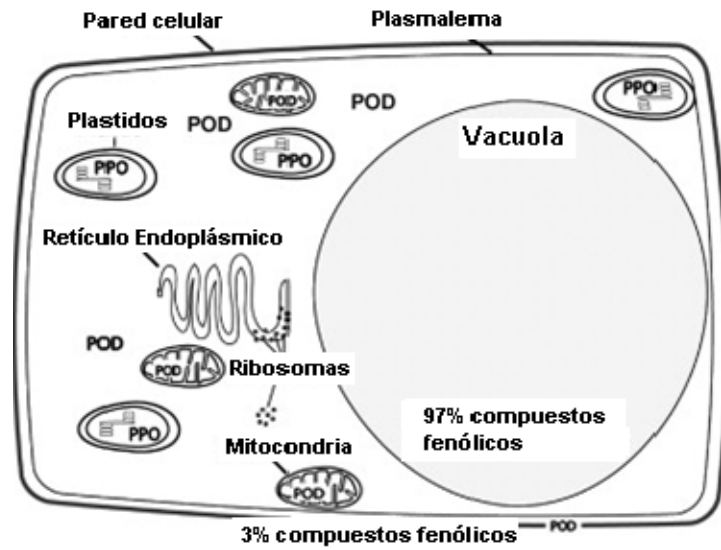


Figura 2. Localización interna y externa de los compuestos fenólicos y las enzimas oxidativas (POD y PPO) en una célula vegetal (Toivonen y Brummell, 2008).

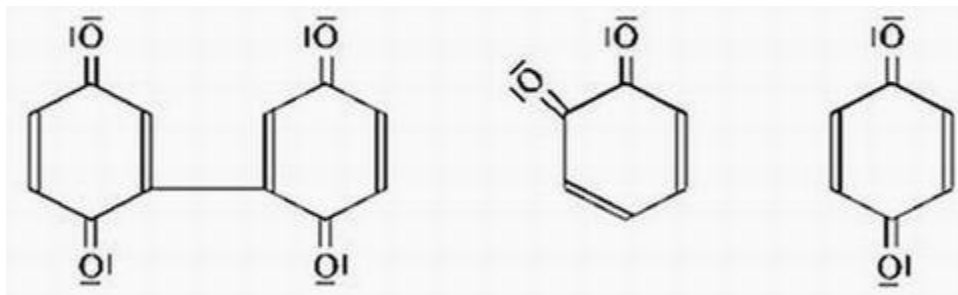


Figura 3. Familia de quinonas, *o*-benzoquinona (izquierda) y *p*-benzoquinona (derecha) (Fennema, 2000).

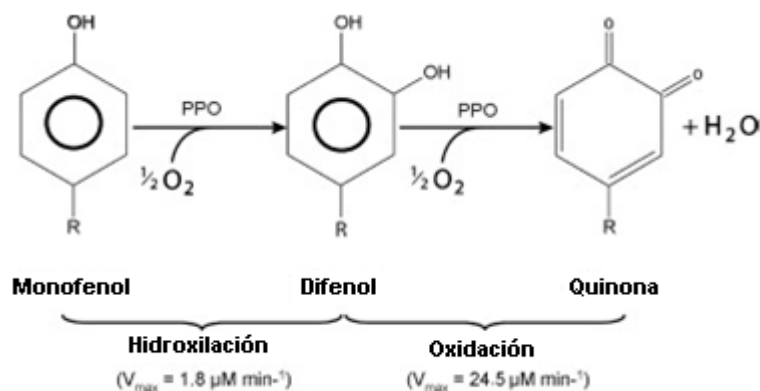


Figura 4. Reacción catalizada por la PPO para generar quinonas (Fennema, 2000).

Recientemente, Jiang et al. (2001) identificaron una antocianasa que catalizaba la hidrólisis de la fracción azúcar de la antocianina a anticianidina. Esto sugirió que la antocianasa puede contribuir al oscurecimiento del pericarpio del litchi por la alta concentración de constituyentes fenólicos (antocianinas) accesibles a la POD y PPO. La antocianasa es conocida también como glicosidasa porque rompe los enlaces glicosídicos (Fennema, 2000).

Jiang et al. (2004) proponen una hipótesis para explicar cómo se degradan las antocianinas provocando el oscurecimiento del pericarpio. Sugieren que las antocianinas son hidrolizadas primero por una antocianasa que remueve las fracciones de azúcar formando anticianidinas las que pueden ser sustrato de la PPO y/o la POD y de esta manera ser oxidadas.

Asimismo, las investigaciones de Jiang et al. (2004) sugieren que el pH del pericarpio influye en la estabilidad de las antocianinas y que mientras el pH fluctúe en rangos menores a 3, las antocianinas mantendrán su forma de ion flavilium generando un color rojo en el pericarpio del fruto; usualmente el pH fisiológico en las vacuolas de la planta es cercano a 3. Cuando el fruto comienza a perder agua el pH de la cáscara aumenta (perdiéndose la capacidad antioxidante del fruto) a valores de 4.1 a 4.7. La pérdida de agua o deshidratación del fruto puede provocar la pérdida de integridad de las membranas, permitiendo la actividad de la enzima PPO debido al contacto que tiene con sus sustratos (Zhang et al., 2001). Existen estudios en extractos de antocianinas aisladas del fruto acerca de cómo su estabilidad se ve influenciada por el cambio de pH del medio bajo la influencia de la actividad del oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el ión

superóxido. Los resultados muestran que en ensayos *in vitro* las antocianinas mantienen su color rojo a un pH de 1.47 (Pang, et al., 2001).

Por otra parte, se debe tener presente que las células del pericarpio del fruto del litchi envejecen rápidamente después de la cosecha potenciando la lipoperoxidación, fenómeno químico que reduce la fluidez de las membranas e incrementa su permeabilidad al O₂ atmosférico, lo que genera la disponibilidad de sustratos a diversas enzimas y el cambio de color (Fennema, 2000).

2.2. Lipoperoxidación de Membranas

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) tales como el ión superóxido (O²⁻), el radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) son extremadamente reactivas y citotóxicas, causan la peroxidación del plasmalema y de las membranas de los organelos intracelulares, produciendo descompartamentación de la membrana, fuga o pérdida del material celular, rápida desecación y muerte celular en casos extremos. Las células tienen mecanismos de detoxificación enzimáticos tales como la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), la peroxidasa (EC 1.11.1.7) y la catalasa (EC 1.11.1.6) y no enzimáticos como los antioxidantes (glutatión, polifenoles, ácido ascórbico, etc.). En condiciones normales estos mecanismos son capaces de contrarrestar la actividad de las EROS y de limitar su efecto negativo en la célula pero, en condiciones de estrés se genera un desequilibrio que conlleva al deterioro de las estructuras y funciones celulares (Rivera, 2005; Zenteno et al., 2008).

El estrés oxidativo ocasionado por factores abióticos como la temperatura, el pH, la deshidratación y el tiempo excesivo de almacenamiento (senescencia) ha cobrado importancia a nivel celular y molecular en las plantas. Una manifestación molecular del incremento en el estrés oxidativo es la peroxidación de los lípidos de la membrana. El deterioro de los lípidos, resultado de un ataque de las ERO, lleva a la pérdida de la integridad y de la fluidez membranal, lo que a su vez afecta la función normal de las proteínas de la membrana. Lo anterior se ve favorecido porque las membranas biológicas son frecuentemente ricas en ácidos grasos insaturados además de estar inmersas en un fluido que contiene metales y que es rico en oxígeno (Yi et al., 2009, Duan, 2010).

La peroxidación inicia con la remoción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado, lo que da como resultado la formación del radical lipídico. El rearrreglo de las dobles ligaduras produce dienos conjugados. El ataque por oxígeno molecular produce

un radical peroxidílico, el cual puede remover un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un hidroperóxido lipídico, o un endoperóxido lipídico que a su vez conduce generalmente a la formación de malondialdehído (MDA), hexanal y el 4-hidroxinonenal como productos de degradación. La cuantificación del MDA se ha usado como indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha usado como un parámetro indicador del estrés oxidativo de las células y los tejidos (Rivera, 2005; Zenteno et al., 2008).

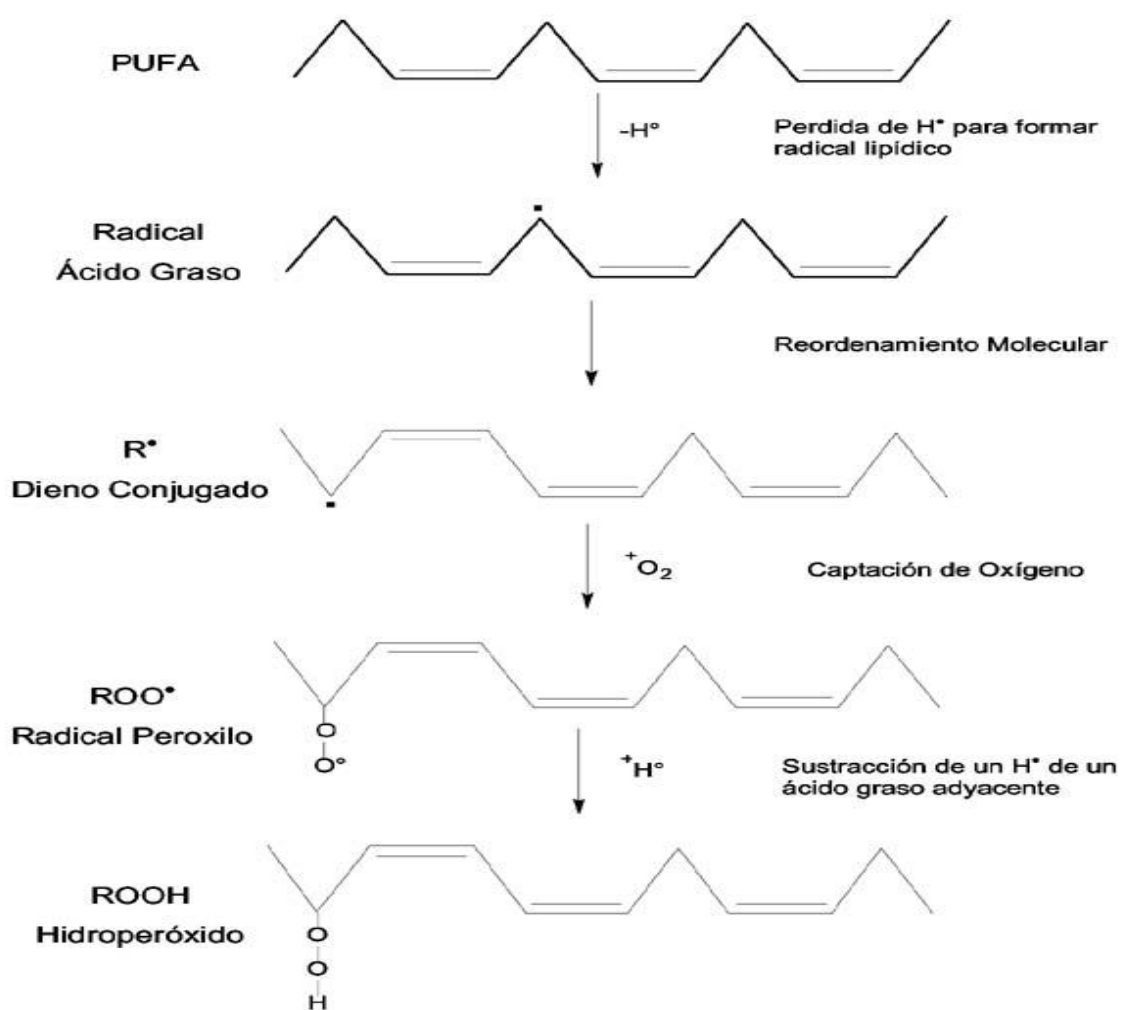


Figura 5. Mecanismo de peroxidación de los ácidos grasos insaturados (Zenteno et al., 2008).

2.3. Trealosa (TRA)

2.3.1. Propiedades

La TRA (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico α -1-1- α de baja energía (1 kcal/mol) comparado con el enlace de la sacarosa (27 kcal/mol) (Schiraldi et al., 2002). Este enlace entre glucosas permite que la molécula presente estabilidad ante factores extremos como la temperatura y el pH, con lo cual se evitan las reacciones de Maillard y la hidrólisis de la TRA a glucosa (Higashiyama, 2002).

Existen tres isómeros de la TRA: α - α -trealosa, α - β -trealosa y β - β -trealosa, de éstas solo la primera se encuentra en materiales biológicos (Bashiti-EI et al., 2005).

La TRA no es tóxica, fue aceptada como un ingrediente inocuo en alimentos en la década de los 90`s en Inglaterra (Roser, 1991) y por el Sistema Legislativo Europeo después de ser aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica (Schiraldi et al., 2002). Actualmente, está considerada como un ingrediente GRAS ("generally recognized as safe") por la FDA (Komes et al., 2005) asignándole diversos usos, tales como la conservación de alimentos deshidratados, la conservación de células congeladas y almacenadas por tiempos prolongados, ya que estabiliza liposomas y evita la oxidación de los ácidos grasos manteniendo la integridad celular. En la industria farmacéutica tiene aplicación en la conservación de vacunas, por ejemplo la vacuna contra la polio protegida con TRA resiste los cambios de temperatura que ocurren durante su transportación. En frutas congeladas y deshidratadas se le ha aplicado en concentraciones de 3-8% (p/v). Algunas de sus características se resumen en el siguiente cuadro 2 (Higashiyama, 2002).

Cuadro 2. Características físico-químicas, sensoriales y de digestibilidad de la TRA (Higashiyama, 2002).

Característica	Valor o Propiedad
Punto de ebullición	
Dihidratada	97.0 °C
Anhidra	210.5 °C
Calor de fusión	
Dihidratada	57.8 kJ·mol ⁻¹
Anhidra	53.4 kJ·mol ⁻¹
Solubilidad	68.9 g/100g de agua a 20 °C
Estabilidad de la solución	>99% a pH 3.5-10, a 100 °C por 24 h >99% a 120 °C por 90 min
Dulzor	45% de la sacarosa
Color	Incolora
Olor	Inodora
Digestibilidad	Absorbida en el intestino delgado

2.3.2. Presencia en organismos anhidrobiontes

La anhidrobiosis es un fenómeno que permite la vida sin agua, se presenta en organismos que son capaces de perder hasta el 99% del agua de sus tejidos y reponerse sin daño celular cuando ésta se encuentra disponible. Estos organismos se denominan anhidrobiontes y ejemplos de ellos son los camarones de agua salada (*Artemia salina*), los nemátodos (*Aphelenchus avenae*), las plantas de la resurrección (*Selaginella lepidophylla*, *Myrothamus flabellifolia* y *Craterostigma plantagineum*), los líquenes, algunos helechos, las semillas ortodoxas, levaduras y bacterias (Crowe, 2002; Bianchi

et al., 1993). Estos organismos llegan a sintetizar TRA en una cantidad equivalente al 20% de su peso seco cuando las condiciones para su sobrevivencia se ven afectadas principalmente por temperaturas extremas o estrés hídrico, es decir, cuando el organismo no tiene un medio idóneo para sobrevivir (Tang et al., 2007).

2.3.3. Biosíntesis

La síntesis de la TRA a escala industrial se inició en 1994 a partir de diferentes métodos; el primero consistía en el cultivo y lisis de células de levadura pero no resultó rentable debido a los bajos rendimientos obtenidos (Higashiyama, 2002). La biosíntesis de la TRA en levaduras comprende la formación de trealosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato por la enzima trealosa-6-fosfato sintasa (TPS), la cual es defosforilada por la enzima trealosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Goddijn y Smeekens, 1998; Penna, 2003). Actualmente, la síntesis de la TRA se realiza utilizando diferentes microorganismos modificados genéticamente con diversas fuentes de sustrato y enzimas como se muestra de manera simplificada en el Cuadro 3 (Schiraldi et al., 2002).

Cuadro 3. Síntesis de la TRA mediante el uso de microorganismo transgénicos (Schiraldi et al., 2002).

Microorganismo	Sustrato	Enzimas
Levadura, hongos	Almidón, maltosa	Trealosa fosfato sintasa
		Trealosa fosfato fosfatasa
		Glucosa fosforilasa
		Trealosa fosforilasa
Bacterias (<i>Artherobacter</i> sp Q36)	Almidón	MaltooligosiTRA (MTS ase)
		MaltooligosiTRA trealohidrolasa
Archaea (<i>Sulfolobus shibatae</i>)	Dextrinas	Trealosil dextrina

El reciente descubrimiento de genes homólogos para la síntesis de trealosa en *Sellaginella lepidophylla*, *Arabidopsis thaliana* y varios cultivos como papa (Wingler, 2002), tabaco, algodón, arroz y trigo (en semillas y plántulas) (Bashiti-EI et al., 2005) sugiere que la habilidad para sintetizar este disacárido puede estar ampliamente distribuida en el reino vegetal; sin embargo, en muchas plantas superiores no se acumula

debido a la presencia de trealosas. La hidrólisis de la TRA puede ocurrir de varias maneras, en *Euglena gracillis* y *Pichia fermentans* se realiza por la trealosa fosforilasa, en *Escherichia coli* ocurre la fosforilación y subsecuente hidrólisis a cargo de la trealosa-6-fosfato-hidrolasa y en plantas, hongos, bacterias y animales participa la enzima trealasa (Goddijn y Smeekens, 1998). Debido a las propiedades protectoras de la TRA en contra de diversas condiciones de estrés (sequía, congelación, daño por frío) se le ha seleccionado como una molécula blanco en la ingeniería genética de plantas para la construcción de organismos transgénicos a los que se les han insertado los genes para la síntesis de este disacárido (Schiraldi et al., 2002).

2.3.4. Función

La TRA tiene una función protectora de estructuras celulares, es útil para estabilizar los lípidos y proteínas de las membranas en estado seco. Existen actualmente dos hipótesis para explicar el mecanismo por el cual este disacárido protege biomoléculas celulares: la hipótesis del reemplazo de agua y la del estado vítreo.

Hipótesis del reemplazo de agua. Se propuso a partir del descubrimiento de la TRA en el nemátodo *Aphelenchus avenae* en los 70's y permitió determinar el efecto que el disacárido tiene en la supervivencia de los organismo anhidrobiontes. Sin embargo, los modelos propuestos se establecieron en el retículo sarcoplásmico y en el sistema de membranas del músculo de langosta (*Homarus americanus*) en donde se encontró que las membranas del tejido liofilizado con TRA mantenían características similares a las del tejido sin liofilizar. Se observó que otros azúcares también preservaban las membranas, pero a concentraciones más altas (superiores al 20%). A partir de este modelo se estableció otro, consistente en liposomas liofilizados en los que se estudió el efecto de diferentes concentraciones de TRA y otros azúcares. Empleando espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier se demostró que en condiciones de sequedad los grupos hidroxilo de la TRA forman puentes de hidrógeno con las cabezas polares de los fosfolípidos de las membranas deshidratadas (Crowe, 2002), promoviendo con ello la separación de las cadenas acilo de los fosfolípidos debido a la reducción de las interacciones de las fuerzas de van der Waals y una disminución de la temperatura de transición (T_g) a niveles similares a los encontrados en los fosfolípidos de las membranas hidratadas. El tamaño y la forma de la TRA impide la interacción y expansión de los grupos polares de los fosfolípidos y provee más espacio que un monosacárido como la glucosa, el cual aunque forma enlaces entre los grupos hidroxilo y fosfato no disminuye

los valores de Tg. También se encontró que es importante que la TRA se encuentre en ambos lados de la bicapa lipídica para que ejerza su función protectora de membranas.

Generalmente la eficacia de la protección viene dada por la concentración de la TRA, consiguiéndose la estabilidad de las proteínas a concentraciones aproximadas de 100 mM (3.7% p/v) y la de lípidos a concentraciones de 0.3 g/g de lípido durante el secado (Tang et al., 2007). Otros estudios recientes han demostrado que aún en concentraciones inferiores a 5 mM (0.185% p/v) en el citoplasma de plantas de tabaco transgénico, se genera tolerancia a la desecación y se promueve la retención de agua (Crowe, 2002).

La TRA es una molécula funcional en la protección de proteínas termolábiles durante el secado en aire y la liofilización. Aunque hay que mencionar que no todas las proteínas son igualmente susceptibles al daño durante el secado, muchas no presentan cambios estructurales en el estado seco (muestran el mismo espectro de infrarrojo de la región amida en el estado seco e hidratado), otras presentan pérdida de la estructura secundaria en condiciones adversas pero este cambio es reversible cuando las condiciones de estrés desaparecen y otras como la fosfofrutoquinasa, la lactato deshidrogenasa y el interferón presentan una pérdida irreversible de la estructura secundaria.

Hipótesis del estado vítreo. La TRA, como otros azúcares, tiene capacidad para pasar a estados vítreos. Los materiales vítreos son sólidos amorfos de alta viscosidad, en los que la movilidad de los componentes inmersos o en contacto con ellos está restringida. La hipótesis del estado vítreo sugiere que el azúcar en su forma vítrea forma una matriz amorfa que rodea y protege a las membranas y sus biomoléculas (lípidos y proteínas) de reacciones adversas durante la deshidratación como la lipoperoxidación y la formación de radicales libres (Furuki et al., 2005).

La temperatura de transición vítrea es la temperatura por encima de la cual el material vítreo comienza a hacerse más fluido, estado llamado "de gota" en el cual las interacciones moleculares aumentan. Otras reacciones adversas como la fusión de vesículas o reacciones entre proteínas y lípidos son inhibidas por el estado vítreo y esto es debido a que las soluciones con TRA aumentan la Tg (115°C) en comparación con la sacarosa (60°C) (Crowe, 2002; Patist y Zoerb, 2005).

2.4. Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos integrado por géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Pueden ser descritos según su morfología como cocos o bacilos Gram positivos no esporulados; anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes. Desde el punto de vista bioquímico son oxidasa, catalasa y bencidina negativos, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de los carbohidratos. A este tipo de fermentación se le denomina homofermentativa ya que la glucosa es degradada por la enzima aldolasa a ácido láctico utilizando sólo la vía de glucólisis (Embden- Meyerhof-Parnas), mientras que las heterofermentativas convierten hexosas a pentosas por la vía de 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo además de ácido láctico, algunos otros productos como el etanol, acetato y CO₂. También pueden ser clasificadas dependiendo de su morfología, crecimiento a diferentes temperaturas, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina (Axelsson, 1998)

Recientemente las bacterias lácticas han tomado importancia en el campo de los alimentos debido a que se ha observado que pueden controlar el crecimiento de diversos microorganismos, es decir, pueden actuar como organismos de biocontrol. Esto debido a su habilidad para acidificar el medio y producir una gran variedad de compuestos con amplio espectro antimicrobiano tales como ácido láctico, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y otros compuestos de bajo peso molecular (ICMS, 1998; Ouwehand, 1998).

2.4.1. *Lactobacillus plantarum* (BAL)

Es una bacteria homoláctica facultativa, debido a que puede emplear al oxígeno como último aceptor de electrones, aunque no cuenta con citocromos (Charalampopoulos, 2010; Fu y Mathews, 1999; Tseng y Montville, 1990). La BAL es frecuentemente utilizada para la producción de ácido láctico a partir de varios azúcares fermentables (lactosa, sacarosa, glucosa y fructosa). Es resistente a altas concentraciones de ácido láctico lo que permite mantener una fermentación casi libre de contaminación (Ingram, 1975; Lücke, 1995, Fu y Mathews, 1999). Este microorganismo es capaz de asimilar

otras fuentes de carbono como pectinas, presentes en las plantas y por lo tanto, son microorganismos dominantes en la fermentación de productos hortícolas (Waldir et al., 2007)

BAL es capaz de producir exopolisacáridos, metabolitos de interés comercial (De Vries et al., 2006) y compuestos con actividad antimicrobiana (ácidos fenil láctico, 4- hidroxifenil láctico, benzoico, 5-metil-2,4-imidazolidinediona, tetrahydro-4-hidroxi-4-metil-2H-pirano-2-ona y 3-(2-metil propil)-2,5-piperazinediona), los cuales son efectivos contra lactobacilos, lactococos, algunos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum* y algunos hongos como *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. Graminearum* y *F. Oxysporum* (Martínez-Castellanos, 2009; Lücke, 1995).

Martínez-Castellanos et al. (2011) estudiaron el efecto de *Lactobacillus plantarum* como productor de ácido láctico *in situ* para la conservación poscosecha de litchi. En este estudio se evaluó la forma de aplicación de la bacteria láctica al fruto, siendo la elegida la aspersión por 90 s seguida de secado. También se probaron diferentes fuentes de carbono: fructosa, glucosa, manosa, rafinosa, galactosa, sacarosa, maltosa, manitol y sorbitol como prebióticos para mejorar la viabilidad y la acidificación producida por la bacteria. Los resultados indicaron que la fuente de carbono que funcionó mejor como prebiótico fue la fructosa. Y en cuanto a su efecto en el fruto, se concluyó que las BAL tuvieron un efecto positivo en la conservación de color rojo del litchi debido a la producción de ácido láctico *in situ*. Además de que se tuvo un efecto significativo en reducción de la pérdida de peso, dicho efecto se explicó por la formación de una biopelícula creada por las BAL que limitaba la fuga de agua por transpiración.

3. ANTECEDENTES

3.1. Tecnologías Disponibles para la Conservación de los Frutos de Litchi

Se han propuesto algunos tratamientos alternativos a la fumigación con SO₂ tales como aplicaciones de vapor caliente (Kaiser et al., 1995), agua caliente acompañada de cepillado y tratamiento con una solución de HCl (Lichter et al., 2000) e inmersión en soluciones calientes del fungicida benomil (Scott et al., 1982) pero ninguna ha sido aceptada ampliamente o establecida comercialmente.

En el período 2005-2009 profesores de los Departamentos de Biotecnología y Ciencias de la Salud de esta universidad participaron en el desarrollo experimental de un tratamiento alternativo que utilizó una película cubriente a base de quitosano, polímero derivado de crustáceos con acción fungicida, para reducir la pérdida de agua de la cáscara que se ha asociado con su oscurecimiento en combinación con la aplicación de microorganismos de biocontrol que a la par que limitan las infecciones poscosecha producen *in situ* un ácido orgánico que ayuda a estabilizar las antocianinas por acidificación del pericarpio (Martínez-Castellanos, 2009). La utilización de *Lactobacillus plantarum* en litchi con este último propósito fue reportada por vez primera en la literatura científica por Martínez-Castellanos et al. (2011).

3.2. Experimento Previo sobre Aplicación de TRA a Frutos de Litchi.

En enero de 2009 se realizó un experimento aplicando por inmersión concentraciones del 5 y 10% (p/v) de TRA a frutos de litchi 'Brewster' cosechados en la finca Santa Sofía en Chiltepec, Oaxaca (Rodríguez-Verástegui et al., 2009). Durante la inmersión, las disoluciones de TRA se mantuvieron a 0 °C para favorecer su infiltración en los frutos, después del tratamiento los litchis se secaron y almacenaron a 7°C y 10 °C, 75-80% HR. La mayor pérdida de peso (PP) registrada en los frutos almacenados a 7 °C sugirió la presencia de daño por frío a esta temperatura; los litchis tratados con TRA al 10% mostraron mayor PP que los tratados con el 5% del disacárido que exhibieron porcentajes de PP similares a los frutos control. El cociente sólidos solubles totales/acidez titulable (SST/AT) mostró mayor cambio en los frutos control que en los tratados, indicando que la TRA al 5 y 10% conservó durante 20 días de almacenamiento los valores de este cociente similares a los frutos recién cosechados. En cuanto al índice de daño (ID, indicador del manchado de la cáscara) no existieron diferencias significativas entre los frutos tratados con 5 y 10% de TRA pero sí entre éstos y los frutos control que

mostraron mayores valores de ID (datos no mostrados). En congruencia con los resultados de PP, el ID fue mayor a 7 que a 10 °C. Una observación interesante fue que la inmersión de los litchis en las soluciones de TRA a 0 °C provocó daño por frío manifestado por un manchado de la cáscara (ID), sin embargo al cabo de 10 días de almacenamiento estos síntomas se redujeron. Se concluyó que las disoluciones de TRA deben mantenerse a temperaturas superiores a 0 °C durante el tratamiento de los frutos para evitar daño por frío, que la temperatura más adecuada de almacenamiento fue 10 °C y que se tuvo una mejor respuesta de los frutos con TRA al 5% (valores menores de PP) que al 10%.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia comercial nacional e internacional del litchi, a la necesidad de sustituir la fumigación con SO₂ por los problemas de salud que puede generar y a la tendencia mundial de buscar tratamientos inocuos y que no contaminen el ambiente, en el presente trabajo se propone la aplicación de *L. plantarum* y el disacárido trealosa solos o en combinación para aumentar la conservación poscosecha del litchi.

5. OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de la trealosa sola o en combinación con *Lactobacillus plantarum* en la conservación de frutos de litchi variedad Brewster.

Particulares

- Determinar la concentración de la trealosa que favorezca el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*.
- Evaluar el efecto de la trealosa y de *Lactobacillus plantarum* en la conservación poscosecha del litchi 'Brewster'.
- Determinar el grado de lipoperoxidación de las membranas del pericarpio de litchi 'Brewster' como un indicador de la estabilidad conseguida por la aplicación de la trealosa y dióxido de azufre.
- Determinar la concentración de antocianinas y productos de oxidación en el pericarpio de los frutos de litchi.

6. HIPÓTESIS

Durante la deshidratación del fruto la aplicación de la trealosa tendrá un efecto protector sobre las membranas de las células limitando la lipoperoxidación, además promoverá el aumento de la cuenta bacteriana de *Lactobacillus plantarum* y por lo tanto de la producción de ácido láctico, todo lo cual favorecerá el mantenimiento del color rojo característico del litchi y la conservación de los frutos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental se dividió en dos etapas. En la primera se buscó la concentración de TRA que pudiera funcionar como prebiótico de la BAL. La segunda etapa consistió en la aplicación de la TRA al 5% (p/v), así como de la BAL y de una combinación de ambos sobre el pericarpio de los frutos de litchi.

7.1. Trealosa

Se empleó trealosa dihidratada de la marca Cargill proporcionada por la empresa Cargill de México, D.F., México.

7.2. *Lactobacillus plantarum*

Se empleó *Lactobacillus plantarum* (APG Euroenzym) cultivado en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) a 30 °C por 36 h y posteriormente se le mantuvo a 10°C hasta su aplicación.

7.3. Primera Etapa. Efecto de la adición de TRA sobre el crecimiento de la BAL

Este efecto se evaluó por el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de bacterias lácticas en agar MRS utilizando concentraciones de TRA de 0, 0.18, 2.6, 5, 7.5 y 10%p/v. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de microorganismos previamente cultivados en medio MRS a 30°C durante un periodo de 36 h y se sembraron alícuotas de cada dilución por extensión en placa (Martínez–Castellanos, 2009).

7.4. Segunda Etapa. Bioensayo con frutos de litchi

Una vez que se estableció la concentración de la TRA (5% p/v), se aplicaron tratamientos de BAL y TRA solos y combinados en frutos de litchi y se monitoreó la calidad de los frutos durante su almacenamiento a 11°C.

7.4.1. Material biológico

Los frutos de litchi (*Litchi chinensis* Sonn 'Brewster') fueron adquiridos en la central de abasto del Distrito Federal en mayo del 2011, el estado de madurez que presentaron fue 3, según la tabla de color (Anexo 1) desarrollada para el CONPELAC por Castillo et al.

(2006). Los frutos fueron seleccionados por uniformidad de color, ausencia de defectos y de daños por enfermedades e insectos.

Los tratamientos aplicados fueron: control, TRA, TRA + BAL (aspersión), BAL (aspersión), dióxido de azufre (fumigación con 50 ppm de SO₂ por 45 min seguida de ventilación e inmersión de los frutos en HCl al 1% v/v por 3 min) como tratamiento de referencia. El diseño del experimento fue completamente al azar con un diseño de tratamientos factorial incompleto. Cada tratamiento contó con tres repeticiones, las unidades experimentales fueron domos de poliláctico (Nutrigo S.A de C. V) de 250 g con 15 frutos cada una.

7.4.2. Aplicación de la TRA

Se preparó una solución de TRA al 5% (p/v) en agua destilada y se le agregó 0.1% (p/v) de detergente líquido como medio surfactante para favorecer la impregnación del disacárido en la superficie del fruto. Para su aplicación los frutos se sumergieron en esta solución por un tiempo de 3 min y se dejaron secar.

7.4.3. Aplicación de BAL sobre la superficie de Litchi

Las BAL fueron cultivadas previamente en medio MRS a 30 °C por 36 h, el pH del medio fue de 4.15. Posteriormente se centrifugó a 959 g a 11°C por 15 minutos. Una vez obtenidos los paquetes celulares se procedió a lavar tres veces con agua peptonada estéril 0.1% (p/v) y se re-suspendieron en solución de fosfatos 0.02M (pH 7.0). La aplicación de la BAL sobre el pericarpio del fruto se realizó mediante el método de aspersión durante 1.5 minutos. La concentración asperjada sobre el pericarpio del fruto fue de 8.33×10^7 UFC /mL.

7.5. Variables de respuesta

7.5.1. Pérdida de peso. Se midió el peso de tres unidades experimentales mediante una balanza granataria Ohaus durante todo el periodo de almacenamiento, calculándose la pérdida de peso en por ciento con respecto al peso inicial de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%PP = \frac{Pi - Pf}{Pi} \times 100$$

En donde: P_i = peso inicial y P_f = peso final

7.5.2. Índice de daño. Se empleó una escala categórica de seis grados, en ella se clasificaron los frutos de acuerdo al % de superficie oscurecida. Para procesar los resultados, los datos fueron primero transformados a una escala numérica (1-10% = 1; 11-20% =2; 21-30% =3; 41-50%= 5 y ≥ 51 =6) y después se aplicó la siguiente ecuación (Martínez-Castellanos, 2009):

$$\sum_{i=1}^{i=n} = \frac{(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) + (5 \times n_5) + (6 \times n_6)}{n}$$

En donde:

n_1 = número de frutos en el grado 1, ..., n_6 = número de frutos en el grado 6,

n = número total de frutos en la unidad experimental.

7.5.3. Sólidos solubles totales (SST). La concentración de azúcares (%) disueltos en la pulpa de litchi fue cuantificada mediante un refractómetro manual a temperatura ambiente (Erma Inc. Tokyo, Japón, A-contrast 11-520-0, rango 0 -32%). Los frutos fueron pelados, se les eliminó la semilla y los arilos se colocaron dentro de una gasa (medio filtrante) para extraer el jugo mediante un exprimidor mecánico. El jugo de litchi se colectó y una gota se colocó en el refractómetro. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.5.4. Acidez titulable (AT). Se cuantificó el porcentaje de acidez presente en el jugo de litchi mediante una titulación volumétrica ácido-base (Castillo-Animas y Pelayo-Zaldívar, 2006) utilizando NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador. La acidez se calculó como porcentaje ácido málico, el ácido orgánico dominante en el jugo de litchi, mediante la ecuación:

$$\%AT = \frac{V \times N \times Meq}{mL}$$

En donde:

V = volumen de NaOH 0.1 N

N = normalidad de NaOH

Meq = miliequivalente de ácido málico expresado en g (0.06705 g/meq)

mL= mL de muestra empleada

7.5.5. Cociente SST/AT. A partir de los datos obtenidos de SST y AT se obtuvo este cociente, el cual debe fluctuar entre 40-100 en los litchis almacenados para que éstos exhiban una calidad gustativa aceptable (Castillo-Animas y Pelayo-Zaldívar, 2006).

7.5.6. Color del pericarpio del litchi. Se midió el cambio de color del pericarpio de cada unidad experimental mediante un colorímetro Hunter-Lab modelo Color Flex (Hunter Associate Laboratory Inc., Reston, VA, USA). Se realizaron dos lecturas por cada fruto en dos puntos equidistantes. La escala utilizada fue CIE- Lab (L*, a*, b*).

7.5.7. Antocianinas Totales. Se cuantificaron mediante el método de pH diferencial publicado por Wrolstad (1976), el cual mide antocianinas monoméricas y se fundamenta en el cambio estructural que sufren estos compuestos por efecto del pH. Las antocianinas en pH 1 se encuentran en la forma flavilium de color rojo y a pH de 4.5 cambian predominantemente a la forma incolora carbinol. Las antocianinas fueron extraídas de la cáscara del fruto por medio de una solución de HCl 0.1M por 2 h (Jacuinde, 2007), transcurrido este tiempo se tomó 1 ml del extracto y se llevó a 5 mL con solución amortiguadora de KCl- HCl a pH 1 y se agitó. Otro mL del extracto se llevó a 5 mL con solución amortiguadora de acetatos pH 4.5 y se agitó. Ambas soluciones fueron leídas en el espectrofotómetro a 520 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción de las antocianinas. El contenido de antocianinas se obtuvo mediante la ecuación:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A \times 10^3 \times PM \times FD}{\varepsilon \times l}$$

$$\Delta A = (A_{pH1}^{520}) - (A_{pH4.5}^{520})$$

En donde:

ΔA = diferencia de absorbancias
L= litro
l= longitud de celda
 ϵ = coeficiente de extinción molar
PM = peso molecular de la antocianina
FD= factor de dilución

En el litchi 'Brewster' la antocianina dominante es la cianidina-3-rutinósido y en menores concentraciones se encuentran la cianidina-3-glucósido y la malvidina-3-acetilglucósido (Lee y Wicker, 1991).

7.5.8. Color del pericarpio del litchi debido a los productos de oxidación. El método se fundamenta en la decoloración de las antocianinas por acción del metabisulfito de potasio y en la resistencia de los compuestos oxidados a ser decolorados por este agente reductor (Wrolstad, 1976). Se tomó 1 mL del extracto ácido de antocianinas, se agregaron 200 μ L de metabisulfito de sodio y se agitó; a otro tubo se le agregó 1 mL del mismo extracto ácido de antocianinas y 200 μ L de agua destilada y se agitó. Ambos tubos fueron leídos a 520 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las antocianinas) y 420 nm (longitud de máxima absorbancia de los productos oxidados).

A partir de los resultados obtenidos se calculó el color total definido como la suma de absorbancias a 520 y 420 nm sin la adición de metabisulfito de sodio (**A**).

$$\text{Color total} = (\text{Abs } 520\text{nm}) + (\text{Abs. } 420\text{nm})$$

También se determinó el color debido a los productos de oxidación (antocianinas poliméricas). Se define a partir de la suma de las absorbancias a 520 nm y 420 nm con adición de metabisulfito de sodio (**B**).

$$\text{Color de los polímeros} = (\text{Abs. } 520\text{nm}) + (\text{Abs. } 420\text{nm})$$

De la absorbancia obtenida de A y B se obtuvo el porcentaje de contribución al color por los compuestos oxidados.

$$\% \text{ productos oxidados} = \frac{B}{A} \times 100$$

7.5.9. Lipoperoxidación de membranas. Este método se basa en la cuantificación de malondialdehído (MDA) producto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas. Se maceraron en nitrógeno líquido 5 g de pericarpio y se homogenizaron con 25 mL de una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 5% (p/v), la mezcla anterior se centrifugó a 4000 x g durante 10 minutos. Un mL del sobrenadante se mezcló con 3 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5% (p/v) en TCA al 10% (p/v) y las muestras se incubaron durante 20 minutos en agua hirviendo, inmediatamente se pusieron en hielo para detener la reacción. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 532 nm y se corrigió la turbidez por la sustracción de la lectura a 600 nm. Las antocianinas también muestran un máximo de absorbancia a 532 nm por lo que fue necesario calibrar el equipo con 4 mL de TCA al 10% (control). La concentración de MDA se calculó empleando el coeficiente de absorptividad molar del malondialdehído ($155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Duan et al., 2010).

7.5.10. Determinación de la viabilidad de BAL sobre el pericarpio el fruto. Se sumergieron cinco frutos seleccionados aleatoriamente de cada unidad experimental en 200 mL de solución fisiológica (0.09 % p/v, NaCl). De cada tratamiento se hicieron diluciones seriadas y se tomaron alícuotas de 100 μL que se sembraron por extensión en placas de agar MRS e incubaron a 30° C durante 36 h. La cuenta de las BAL se expresó en unidades formadoras de colonia por gramo de fruto (UFC/g fruto). Las colonias de *L. plantarum* se distinguieron por su morfología colonial (Martínez-Castellanos, 2009).

7.6. Análisis estadístico

Para evaluar los efectos significativos de los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparación de medias por el método de Tukey Kramer ($\alpha \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Primera Etapa. Efecto de la adición de TRA sobre el crecimiento de BAL.

Se realizaron 2 experimentos con la finalidad de encontrar la concentración de la TRA a la cual aumentará la cuenta bacteriana de la BAL en el medio MRS. Para el primer experimento se probaron tres concentraciones de la TRA: 0.18%, 2.6% y 5% (p/v), pero ninguna tuvo efecto sobre el crecimiento de la BAL. Se procedió entonces a realizar el segundo experimento con el objetivo de buscar si existía una concentración inhibitoria de la TRA hacia la BAL; se probaron las concentraciones de 5%, 7.5% y 10% (p/v), sin embargo tampoco hubo efecto de la TRA sobre la cuenta bacteriana en medio MRS (Fig. 6) de acuerdo con el análisis de varianza de un factor efectuado ($\alpha \leq 0.05$).

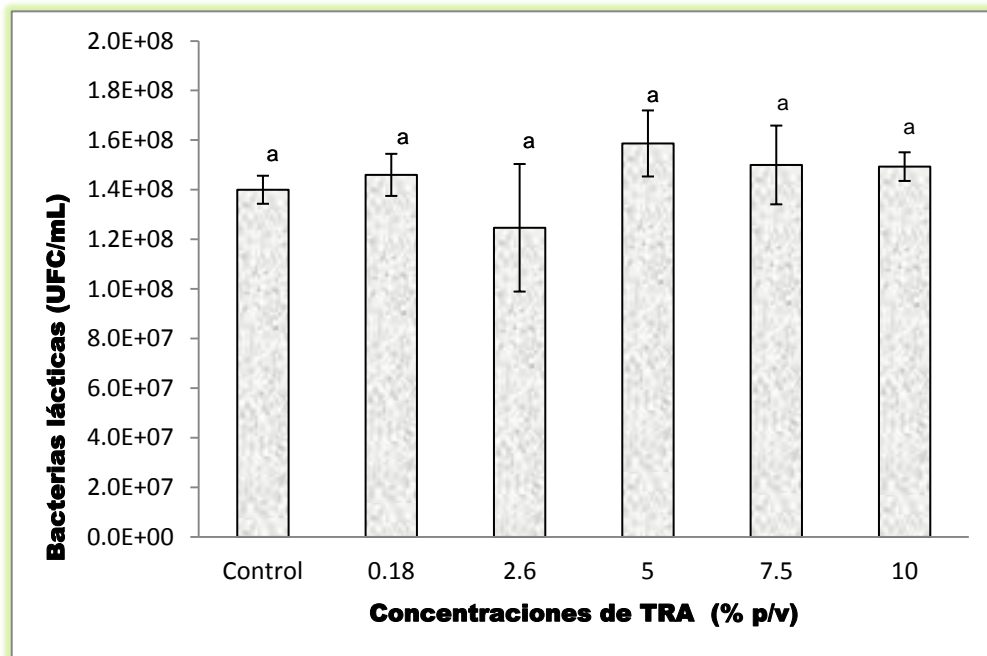


Figura 6. Cuenta de UFC/mL de *L. plantarum* en medio MRS a las 36 h de inoculación. La barra es el promedio de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.

Tal comportamiento indicó que la BAL no utilizó el disacárido TRA como fuente de carbono, sino que usó la glucosa presente en la formulación del medio MRS que como se sabe, es una fuente de carbono fácil de metabolizar por diversos microorganismos. Se planteó entonces la hipótesis de que posiblemente *in vitro* mostró este comportamiento pues se desarrolló en un medio que contiene los nutrientes esenciales en cantidades

suficientes, sin embargo al asperjarse sobre la superficie del fruto y desarrollarse en un medio con poca disponibilidad de azúcares (cáscara) utilizaría la TRA como fuente de carbono y aumentaría la cuenta bacteriana de la BAL. Para el bioensayo posterior se seleccionó la concentración de 5% (p/v) de TRA debido a los resultados experimentales previos ya mencionados (conservación del cociente SST/AT y menor pérdida de peso con referencia al control), además de que dicha concentración no mostró efecto adverso sobre el crecimiento de la BAL.

8.2. Segunda Etapa. Bioensayo con frutos de litchi

8.2.1. Pérdida de peso. No se observó efecto ($\alpha \leq 0.05$) de ningún tratamiento en la pérdida de peso, sin embargo ésta fue menor al 10% en todos los casos (Fig. 7) que es la máxima aceptada comercialmente (Castillo-Animas y Pelayo-Zaldívar, 2006). Este resultado pudo deberse a que se mantuvo una alta humedad relativa en la cámara ($92 \pm 2\%$) durante los 21 días de almacenamiento refrigerado ($11 \pm 1^\circ\text{C}$). Rodríguez-Verástegui et al. (2009) reportaron que los litchis de la misma variedad almacenados a 10°C pero a una HR de 75% mostraron mayores pérdidas de peso, lo que ocasionó un rápido deterioro del fruto.

La pérdida de peso se debe en un 95% a la pérdida de agua por transpiración, la cual puede incrementar cuando las condiciones de transporte, manejo en huerta y almacenamiento de la fruta son inadecuados, generándose daños en la superficie del fruto y una reducción en el peso neto de los envases. Se ha reportado que el litchi var. Brewster a temperaturas de 4°C (cuando se aplica SO_2) y 7°C (sin tratamiento alguno) conserva sus características de calidad por 19 días. La disminución de agua en los tejidos de los frutos propicia un aumento en la actividad metabólica debida a un incremento de la respiración; lo anterior promueve cambios estructurales en las membranas celulares lo que facilita el contacto entre enzimas y sustratos desencadenando el oscurecimiento de la cáscara (Holcroft, 1996; Jiang y Fu, 1999).

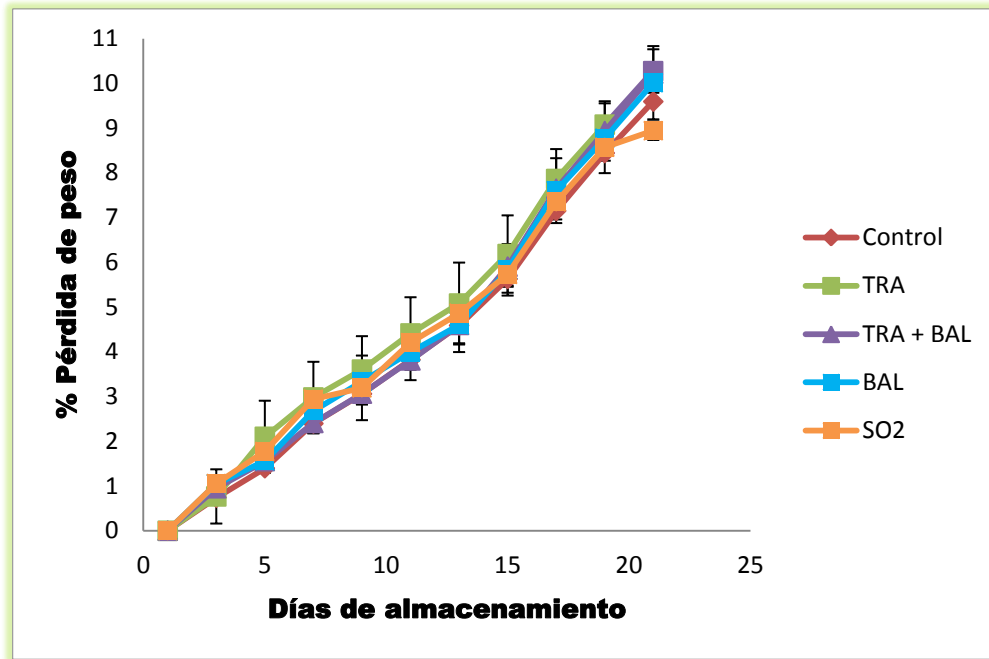


Figura 7. Pérdida de peso de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\% \text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE.

8.2.2. Índice de Daño (ID). No se observó efecto de los tratamientos en esta variable, sólo los frutos control a los 14 días de almacenamiento mostraron un ID significativamente más bajo que el de los frutos tratados, probablemente debido a la HR alta de la cámara de refrigeración (Fig.8). El tratamiento control presentó diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con respecto a los demás tratamientos (Fig. 8), conservando un valor similar al inicial durante los primeros 14 días de almacenamiento pero mostrando un incremento considerable al alcanzar el día 21 debido al pardeamiento característico que alcanza por el proceso de senescencia.

El valor de ID inicial fue de 2.5 y al final del almacenamiento los frutos con los valores más bajos fueron los tratados con TRA y BAL (2.9 y 3.2, respectivamente), aunque no mostraron diferencia significativa con respecto a los litchis de los tratamientos TRA + BAL y Control.

El valor de ID inicial fue de 2.5 alcanzando valores de 4 al final del almacenamiento en los frutos del tratamiento TRA + BAL; sin embargo, los litchis de este tratamiento conservaron el valor inicial durante los primeros 7 días de almacenamiento,

incrementando a los 14 y 21 días sin mostrar diferencia entre ambos. Los frutos del tratamiento con BAL mostraron valores de ID similares durante el almacenamiento, lo cual sugiere que se evitó en cierto grado la degradación de las antocianinas y la polimerización de los compuestos oxidados.

En los frutos del tratamiento con SO₂ (Fig. 8) sólo se determinó el desarrollo de color, ya que la cáscara sufre un desmanchado durante la fumigación con este producto químico (Sivakumar et al., 2007), por lo que el ID de los frutos de este tratamiento se redujo después de la fumigación, alcanzando después de 18 días un valor similar al inicial (ID=2.9)

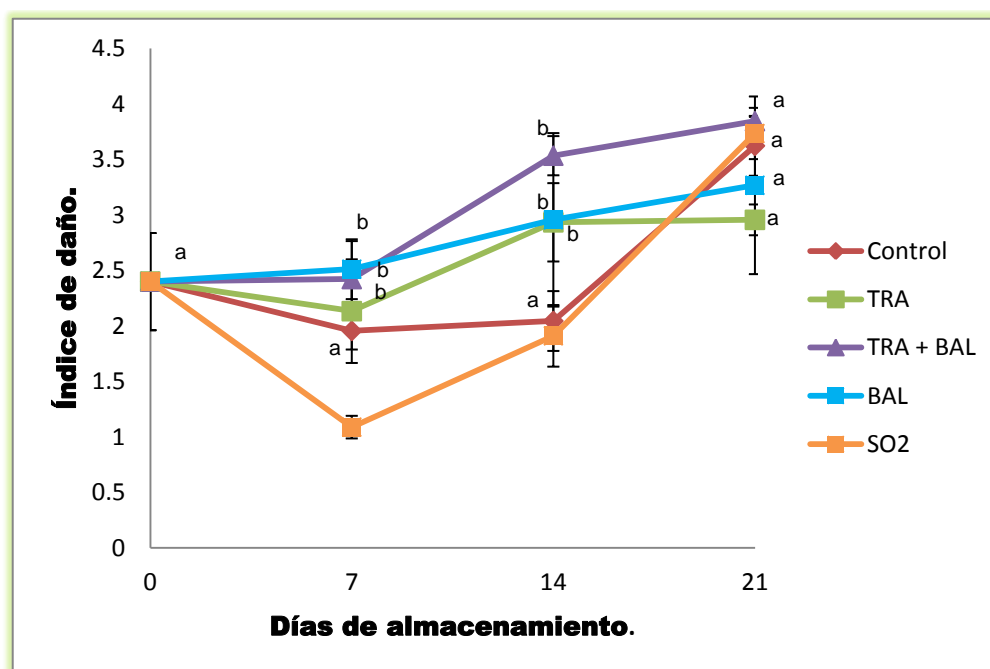


Figura 8. Índice de daño de litchi 'Brewster' almacenado 21 días a 11± 1°C y 92 ± 2%HR. Media de 3 repeticiones ± DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

8.2.3. Cociente Sólidos Solubles Totales/Acidez Titulable (SST/AT). Los frutos que conservaron mejor el cociente SST/AT fueron los control y los tratados con la TRA a los 14 días y sólo los control a los 21 días de almacenamiento (Fig. 9). Los cocientes SST/AT de los demás tratamientos tendieron a aumentar conforme el tiempo de almacenamiento transcurrió, sin presentarse diferencias significativas. Dicho comportamiento se debe a la disminución en la AT (expresada como por ciento de ácido málico) ya que los ácidos

orgánicos son consumidos como sustrato respiratorio y los SST se mantienen; éste comportamiento ha sido referenciado en diferentes trabajos sobre litchi (Sivakumar et al., 2007; Jacuinde, 2007; Martínez- Castellanos, 2009).

Los sólidos solubles no aumentaron considerablemente al final del almacenamiento fluctuando entre 18 y 20 y la acidez varió entre 0.5 y 0.15 % al inicio y final del almacenamiento, respectivamente. Los frutos de los tratamientos TRA + BAL, BAL y dióxido de azufre sobrepasaron por pocas unidades (cerca de 11) el cociente de calidad aceptado para la comercialización (40-100), lo cual indica que los litchis de estos tratamientos están más senescentes y no podrían ser comercializados; los frutos tratados con TRA y el control por el contrario, mantuvieron valores entre 90-70.

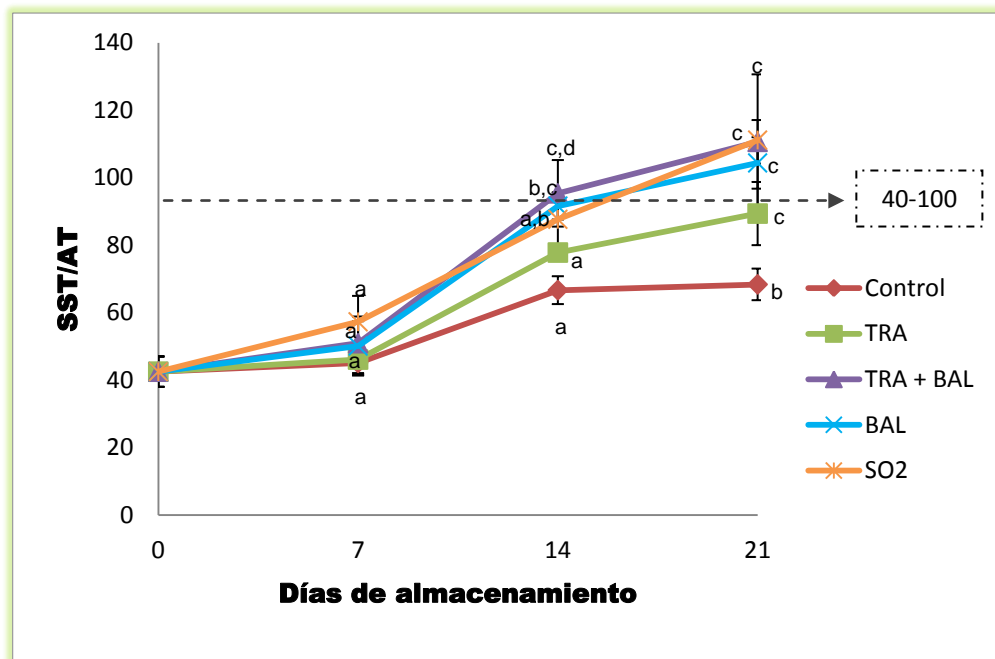


Figura 9. Cociente SST/AT de litchi 'Brewster' almacenado a 21 días a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\% \text{HR}$. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

8.2.4. Determinación de parámetros de color C^* y h . El parámetro C^* indica que tan vivo u opaco es el color, entre mayor sea el valor el color será más vivo y entre más pequeño, resultará más opaco. El valor de h , por su parte, indica un ángulo en la esfera del color y se refiere a los cambios en el tinte, matiz o lo que se conoce en el lenguaje común como color. El valor L^* se refiere a la luminosidad o claridad del color, a valores más altos el color es más claro y a valores más bajos se vuelve más oscuro (Konica Minolta, 2011).

Los frutos tratados con SO_2 presentaron valores de C^* significativamente más bajos ($\alpha \leq 0.05$) a los 7 y 14 días de almacenamiento con respecto a los demás tratamientos; en cuanto al valor h , éste se mantuvo más bajo que el control a lo largo de 14 días y aumentó en el día 21, mientras que el valor de L^* fue similar al control durante 21 días de almacenamiento. Estos resultados indican que el color de los litchis fumigados, inicialmente perdido durante la fumigación, se recupera durante el almacenamiento, aunque el color desarrollado no es vívido sino opaco (véase Figs. 11, 12 y 13).

Los frutos del resto de tratamientos en general, lograron mantener los parámetros C^* , h y L^* similares al valor inicial a lo largo del almacenamiento, observándose efectos significativos ($\alpha \leq 0.05$) entre tratamientos a los 7, 14 y 21 días (Fig. 11 y 12). Los frutos tratados con la TRA a los 14 días mostraron un color más vívido y más claro que el control (valores más grandes de C^* y L^*), mientras que los tratados con la BAL a los 7 días y los tratados con la TRA a los 14 y 21 días de almacenamiento exhibieron valores mayores de h (color rojo vívido).

Interpolando los valores de C^* y h en la rueda de color, se observa un color rojo al inicio del almacenamiento (Fig. 10, círculo negro) y cambios de color con el paso del tiempo (Fig. 10, con rectángulos se representan los diferentes tiempos de almacenamiento).

Estos resultados de color son similares a lo reportado por Martínez-Castellanos et al. (2011). Sus valores indicaron un decremento significativo a lo largo del almacenamiento con respecto a los valores iniciales de $L^* = 30.5$, $C^* = 30$ y $h = 32$ en los frutos tratados con quitosano y la preservación del color (poco cambio en los valores de C^* y h) en los frutos tratados con BAL, indicando que dicho efecto se debió a la estabilización de las antocianinas por la generación in situ de ácido láctico.

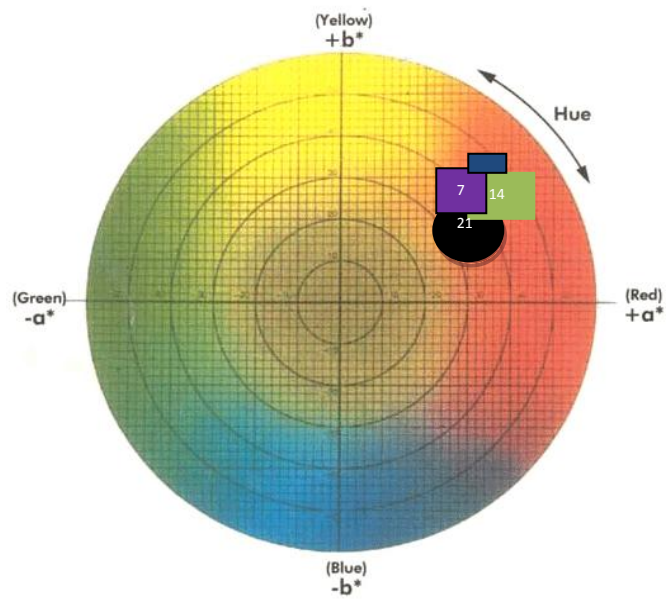


Figura 10. Interpolación en la esfera de color de los valores iniciales de C^* y h (círculo negro) y de los frutos tratados y control a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

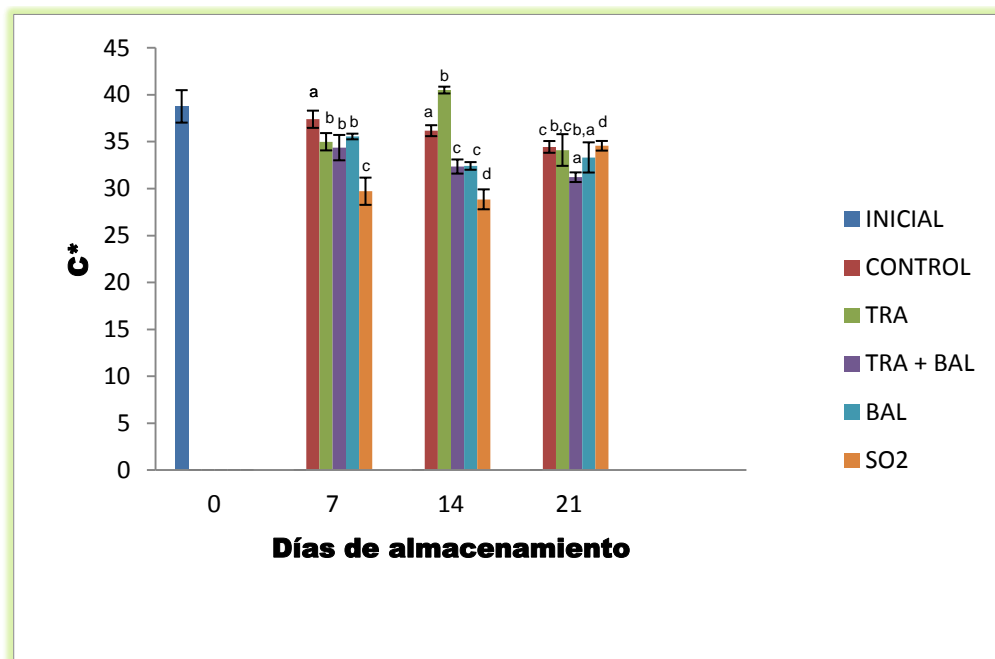


Figura 11. Parámetro C^* en el pericarpio del litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\% \text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.

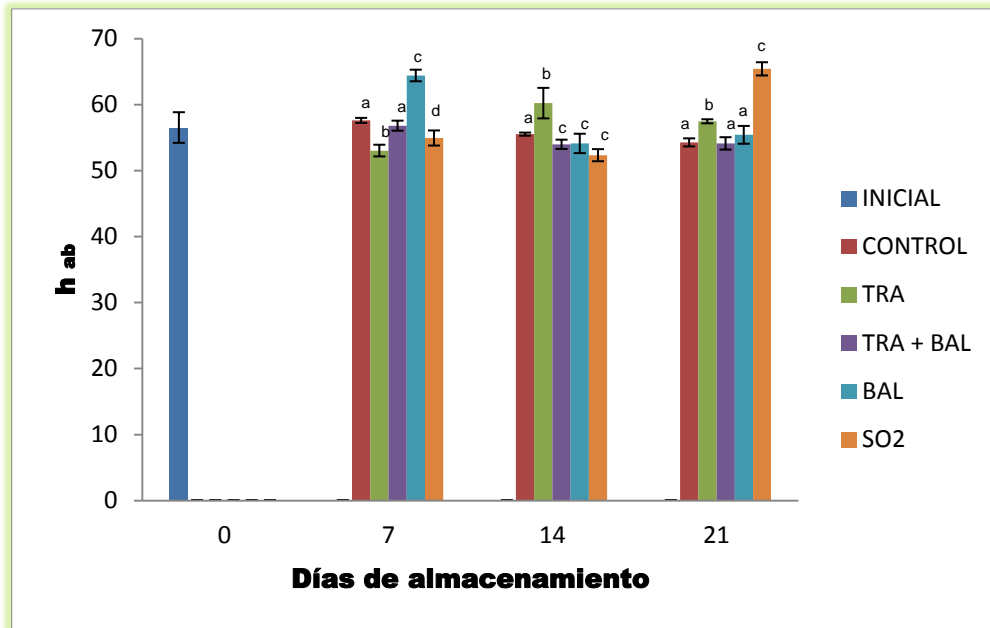


Figura 12. Parámetro h en el pericarpio del litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\% \text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.

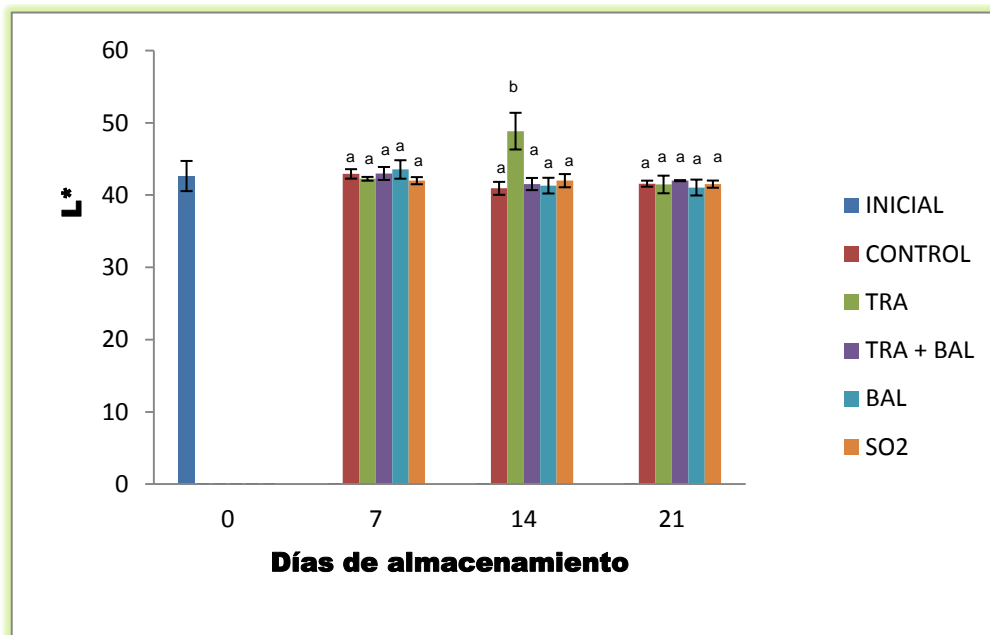


Figura 13. Parámetro L* en el pericarpio del litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\% \text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.

8.2.5. Antocianinas totales. En los frutos control el contenido de antocianinas se mantuvo durante todo el período de almacenamiento probablemente debido a la humedad tan alta

que prevaleció en el frigorífico, mientras que en los frutos tratados con dióxido de azufre (SO_2) la concentración de estos pigmentos se elevó en más del 50% a los 7 días, se duplicó a los 14 días y finalizó a los 21 días de almacenamiento con una concentración intermedia entre las dos anteriores (Fig. 14). Este resultado corrobora el efecto reportado para el SO_2 y confirma su papel estabilizante de las antocianinas y de fuerte agente reductor que inactiva a las enzimas promotoras del oscurecimiento del pericarpio del litchi (Holcroft y Mitcham, 1996; Sivakumar et al., 2007). En el resto de los tratamientos se observa que la concentración de antocianinas es mayor a los 14 y 21 días con respecto al valor inicial; Lee y Wicker (1991) y Zheng y Tian (2006) trabajando con litchi de las variedades Brewster y Huaizhi obtuvieron resultados similares en frutos control y en los tratados con ácido oxálico a diferentes concentraciones, adjudicando dicho comportamiento a la síntesis neta de antocianinas. La concentración de antocianinas en los frutos tratados con BAL y TRA + BAL fue significativamente mayor ($\alpha \leq 0.05$) que en los litchis control a los 7 días, pero no en los tratados sólo con la TRA. Sin embargo, a los 14 días de almacenamiento los litchis de los tres tratamientos mostraron una concentración de pigmentos significativamente más alta que el control, efecto que se perdió a los 21 días probablemente debido a la sensibilidad de los pigmentos a los cambios de pH en los tejidos y a la temperatura de almacenamiento (Holcroft y Mitcham, 1996; Sivakumar et al., 2007; Zheng y Tian, 2006). Cuando la temperatura interna del fruto aumenta por efecto de la respiración como respuesta a la cosecha, el pH de la célula incrementa propiciando la actividad enzimática y la degradación de antocianinas lo que genera compuestos de oxidación susceptibles de polimerizarse y producir colores que van desde el café hasta el negro en el pericarpio (Torskangerpoll y Andersen 2005).

El tratamiento con la BAL conservó la concentración de antocianinas en el pericarpio de los frutos a lo largo del almacenamiento, lo cual confirma lo reportado por Martínez-Castellanos et al. (2011). Este resultado sugiere que las bacterias inoculadas sobre la superficie del fruto generaron ácido láctico, capaz de mantener un pH adecuado para la estabilización de estos pigmentos a lo largo del almacenamiento.

Al eliminar los datos del tratamiento con SO_2 del análisis estadístico (pues su efecto es notablemente diferentes del resto de los tratamientos y se encuentra ya establecido) se observa que el tratamiento con BAL mostró diferencias significativas y una alta concentración de antocianinas (48.7 mg/g b.s.) con respecto al control (28.6 mg/g b.s.). Asimismo, se observaron valores semejantes en la concentración de estos pigmentos en los frutos tratados con BAL y TRA + BAL (49.7 mg/g b.s.).

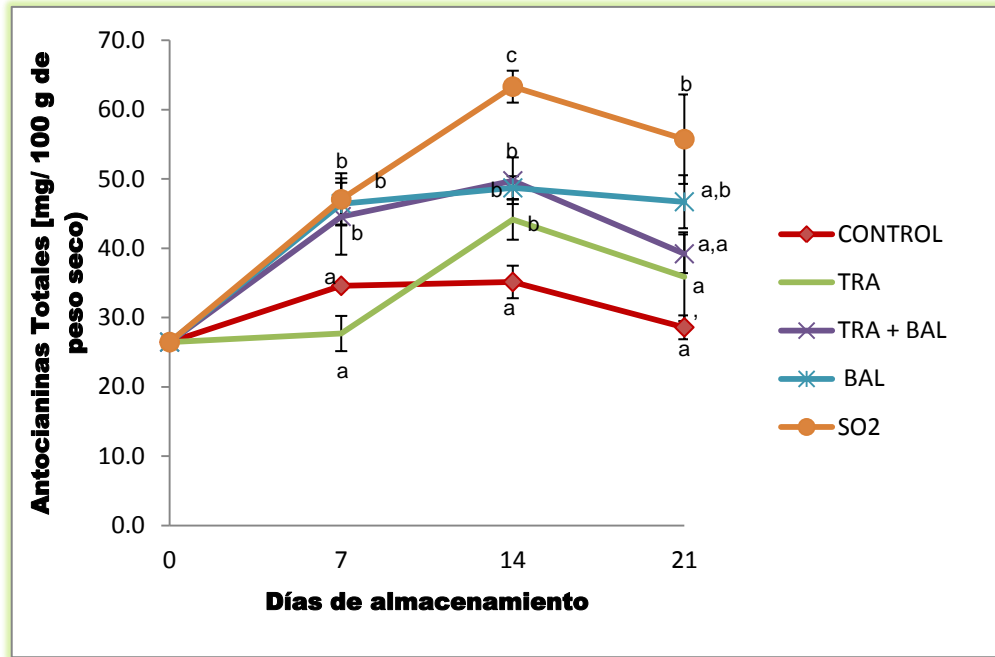


Figura 14. Determinación de antocianinas monoméricas en litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

8.2.6. Color del pericarpio del litchi debido a los productos de oxidación. El proceso de oscurecimiento se inicia en las células del epicarpio seguido por las células del mesocarpio y endocarpio (Underhill y Critchley, 1995). Martínez-Castellanos et al., (2011) determinaron que la aplicación de BAL sobre el pericarpio del fruto retrasaba la aparición de colores oscuros con respecto al control como resultado de la síntesis de ácido láctico en la cáscara del fruto.

En la Fig. 15 se observan diferencias significativas en el porcentaje de contribución de compuestos poliméricos al color de litchi entre tratamientos a los días 7, con los valores más bajos en los frutos control y tratados con TRA y BAL; sin embargo, a los 14 y 21 días no hay diferencia entre tratamientos con respecto al control. Los frutos tratados con SO_2 , contrario a lo esperado, presentaron los valores más altos. Estos resultados sugieren que el contenido de compuestos poliméricos varía independientemente de la concentración de antocianinas. Contrariamente a lo encontrado en este trabajo, Neog y Saikia (2010) reportaron en litchi 'Muzaffarpur' sometido a diversos tratamientos a base de agua caliente, agua fría, aire caliente y sumergidos en soluciones de ácido clorhídrico, ácido

ascórbico o metabisulfito de sodio, un incremento significativo en el porcentaje de compuestos poliméricos a los 9 días de almacenamiento a 27°C y 79% HR, encontrando una relación inversa entre el contenido de antocianinas y el porcentaje de contribución de compuestos poliméricos.

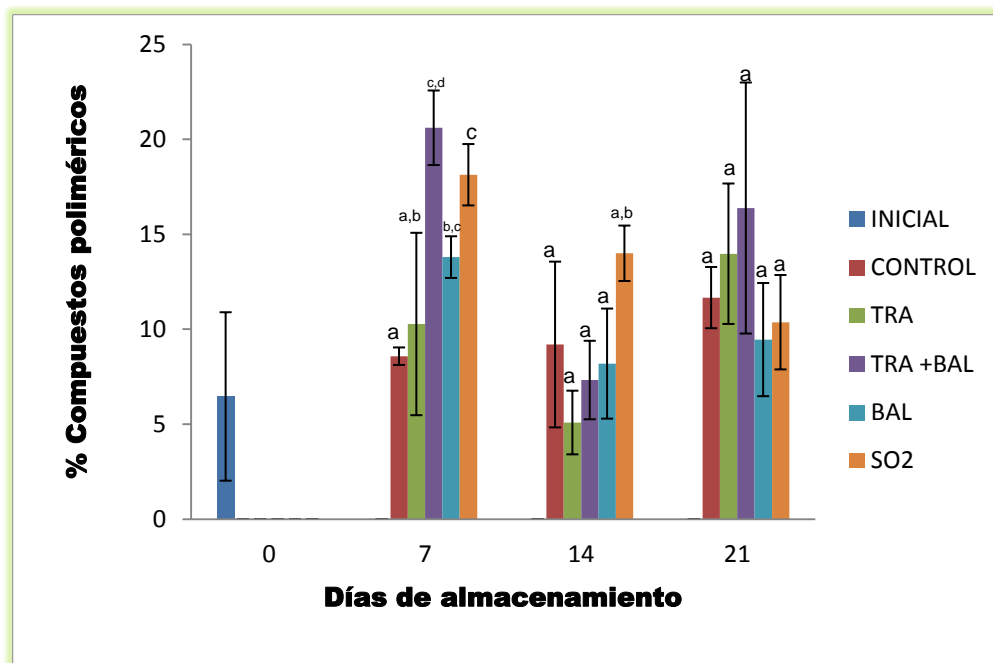


Figura 15. Porcentaje de contribución de compuestos poliméricos al color de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\% \text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes entre histogramas denotan diferencia significativa.

En las Fig. 16, 17 y 18 se representa el color del pericarpio del litchi durante el almacenamiento por una barra vertical, correspondiendo la parte superior a la contribución por compuestos no poliméricos (antocianinas monoméricas) y la inferior a la contribución por compuestos poliméricos (CP). Como se observa, el porcentaje de los primeros es mayor que el de los segundos, lo cual indica que el color que domina en el pericarpio es rojo, en concordancia con los valores C^* y h observados (véase más adelante).

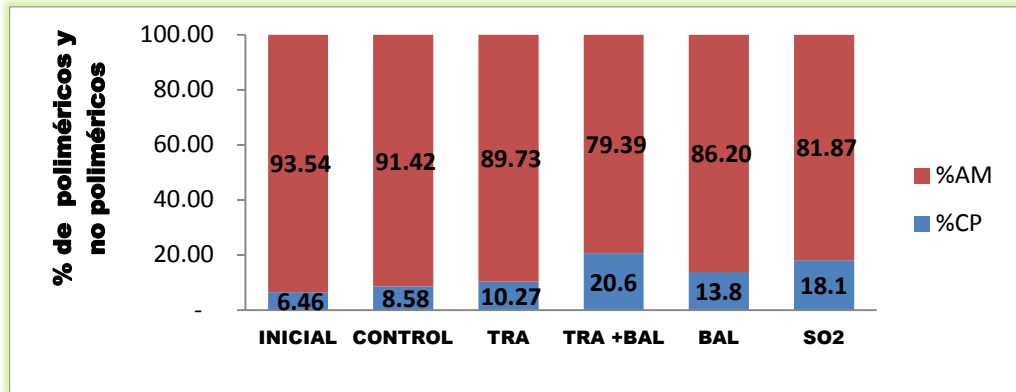


Figura 16. Comparación de compuestos poliméricos y no poliméricos de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 8 días. AM: antocianinas monoméricas; CP: compuestos poliméricos. Media de 3 repeticiones \pm DE.

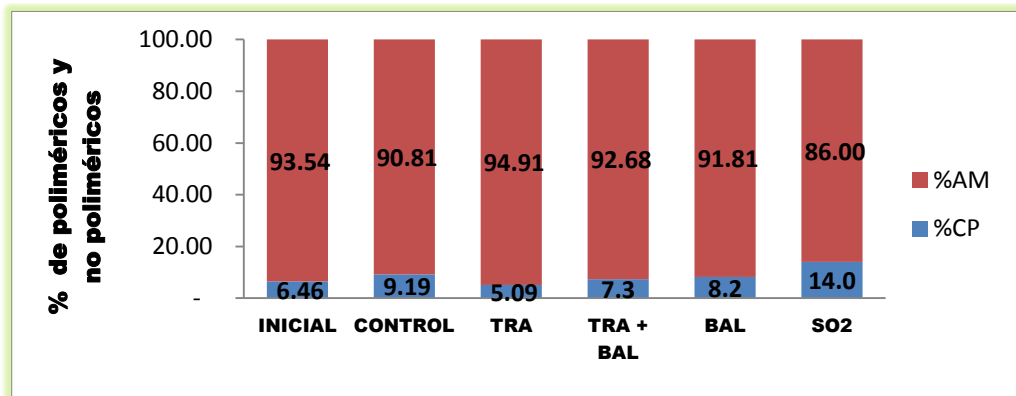


Figura 17. Comparación de compuestos poliméricos y no poliméricos de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 16 días. AM: antocianinas monoméricas; CP: compuestos poliméricas. Media de 3 repeticiones \pm DE.

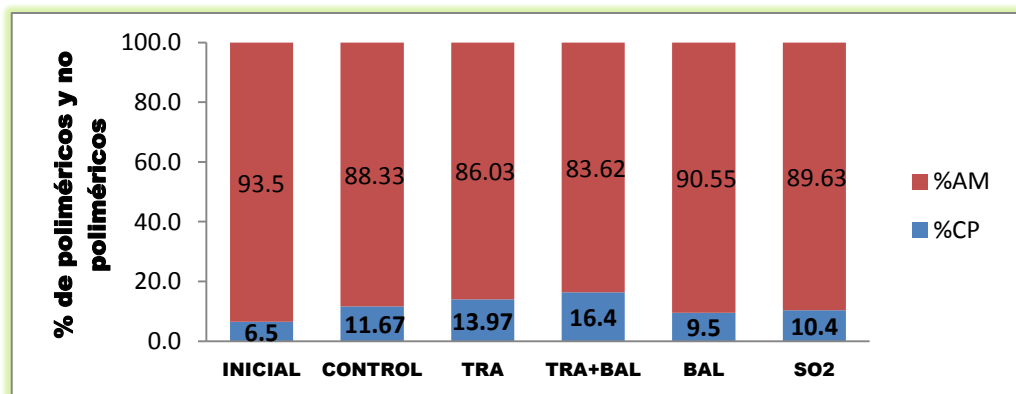


Figura 18. Comparación de % de compuestos poliméricos y no poliméricos de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. AM: antocianinas monoméricas; CP: compuestos poliméricas. Media de 3 repeticiones \pm DE.

8.2.7. Lipoperoxidación de membranas. La Fig. 19 muestra que sólo hay diferencias significativas en la síntesis de MDA a partir de la oxidación de lípidos entre tratamientos en el día 14 de almacenamiento. La mayor concentración de MDA se encontró en los frutos tratados con SO₂ seguidos por los tratados con la TRA y el control. Estos datos indican que los tratamientos aplicados indujeron condiciones de estrés sobre las membranas celulares promoviendo su oxidación. Similarmente, Duan et al. (2010) reportaron concentraciones de MDA cercanas a 16 nM/g de pericarpio (significativamente mayores con respecto al control) a los 8 días de almacenamiento a 28°C y 90-95% HR en frutos de litchi 'Huazhi' que fueron sometidos a atmósferas de oxígeno puro. Las concentraciones de MDA obtenidas en el presente estudio fueron menores a 10 nM/g de pericarpio en todos los tratamientos aplicados, esto puede deberse a la variedad utilizada, al diferente tratamiento poscosecha aplicado, a las diferentes condiciones de almacenamiento y posiblemente a que las antocianinas actuaron como agentes que evitaron la lipoperoxidación por su capacidad antioxidante (Duan et al., 2007). Por el contrario, Zheng y Tian (2006) reportaron que la aplicación de compuestos químicos como el ácido oxálico y el fungicida Bavistin, limitaron la producción de MDA con respecto al control en litchi 'Huazhi'.

La fumigación con SO₂ es un tratamiento agresivo que puede generar concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno, las que actuando sobre los lípidos de las membranas generarían las concentraciones elevadas de MDA observadas.

La TRA, como carbohidrato protector que evita el colapso de las membranas por su unión con los fosfolípidos o proteínas de las membranas celulares, se esperaba que evitara o limitara la peroxidación de los lípidos (Roser, 1991; Crowe, 2002; Sivakumar et al., 2007); sin embargo, el resultado obtenido sugiere que probablemente no logró infiltrarse en el pericarpio del litchi en suficiente concentración como para producir el efecto esperado.

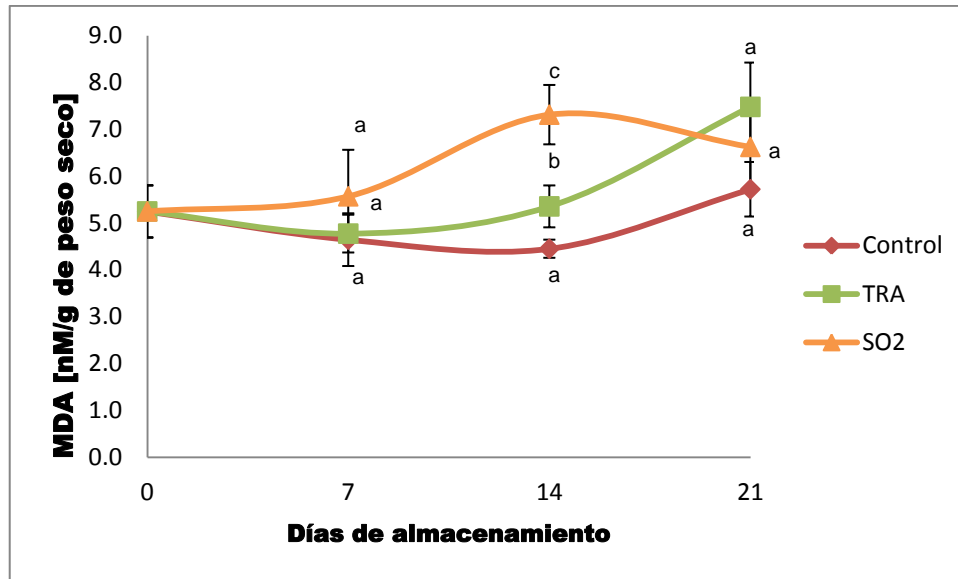


Figura 19. Concentración de MDA del litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%$ HR por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

8.2.8. Determinación de la viabilidad de BAL en el pericarpio el fruto. La viabilidad de la bacteria mostró un descenso en los frutos de los tratamientos TRA + BAL y BAL de aproximadamente 1 y 2 ciclos logarítmicos al día 7, respectivamente, manteniéndose sin cambio en los días 14 y 21 (Fig. 20). Los valores de viabilidad entre tratamientos mostraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) a los días 0 y 7; es difícil encontrar una explicación a este comportamiento ya que es poco probable que la TRA haya tenido un efecto prebiótico en la BAL debido a que en los frutos de ambos tratamientos los valores de UFC/g de fruto mostraron una tendencia descendente y no se observaron diferencias entre ellos a los 14 y 21 días.

Cuando la BAL fue aplicada por inmersión, la cuenta de UFC/g de fruto aumentó 1 ciclo logarítmico, desafortunadamente los frutos presentaron infecciones al cabo de 7 días de almacenamiento debido a que antes de sumergirlos en la suspensión de BAL se les lavó, afectando posiblemente con ello la flora natural y favoreciendo el crecimiento de microorganismos oportunistas, principalmente hongos.

De acuerdo con Chen et al. (2007) y Andersson y Radstrom (2002), *Lactobacillus plantarum* es capaz de consumir la TRA, y como además se ha observado que en cultivos donde se sustituye la glucosa totalmente por la TRA (20g/L), la acidez del medio es significativamente menor (pH 4.16) con glucosa que con TRA (pH 4.97), se puede pensar que esta última está siendo empleada en la síntesis de bacteriocinas (Chen et al., 2007) y no en la producción de ácido láctico o biomasa (Li y Chen, 2009). Asimismo, la baja cuenta de levaduras reportada por Martínez- Castellanos (2009) y corroborada en el presente trabajo (Fig. 21) pudo deberse a que la producción de ácido láctico por la BAL limitó su proliferación. La morfología de BAL fue confirmada por tinción de Gram, la que al mismo tiempo indicó que no hubo crecimiento de levaduras a los días 0, 7 y 14 pero, sí a los 21 días (Fig. 21).

En los frutos control y tratados con la TRA se observó crecimiento de hongos con micelio blanco y levaduras al final del almacenamiento (Fig. 21). El medio empleado para determinar la viabilidad de las BAL es selectivo para este género, sin embargo pueden crecer levaduras, por lo que en estudios posteriores se puede efectuar el conteo de éstas para tener un dato más certero. En este estudio se presenta una gráfica del crecimiento de levaduras durante el almacenamiento, sin embargo la cuenta en el medio MRS no fue mayor a 30 colonias por lo que no se consideró representativa.

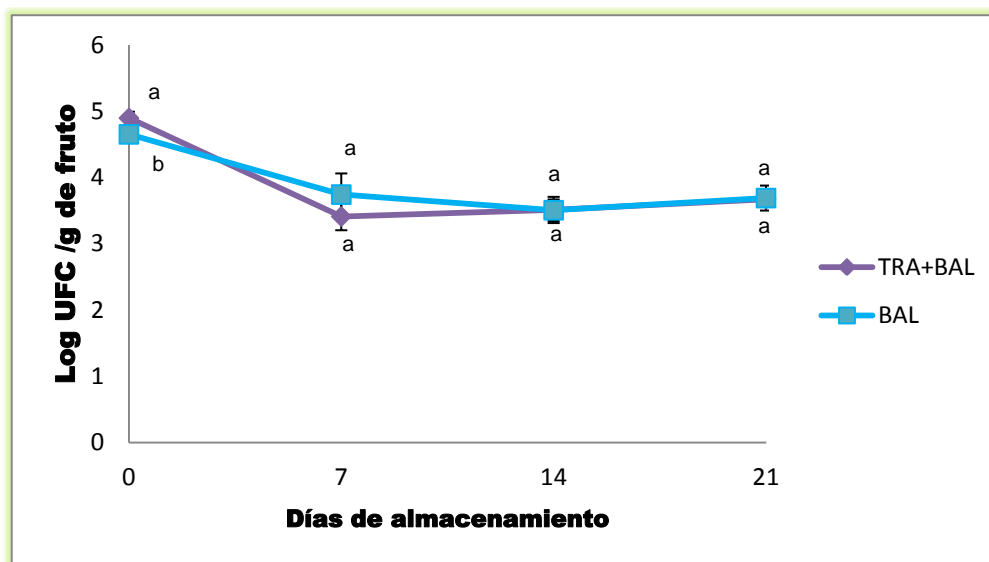


Figura 20. Viabilidad de la BAL en frutos tratados con TRA + BAL y BAL de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

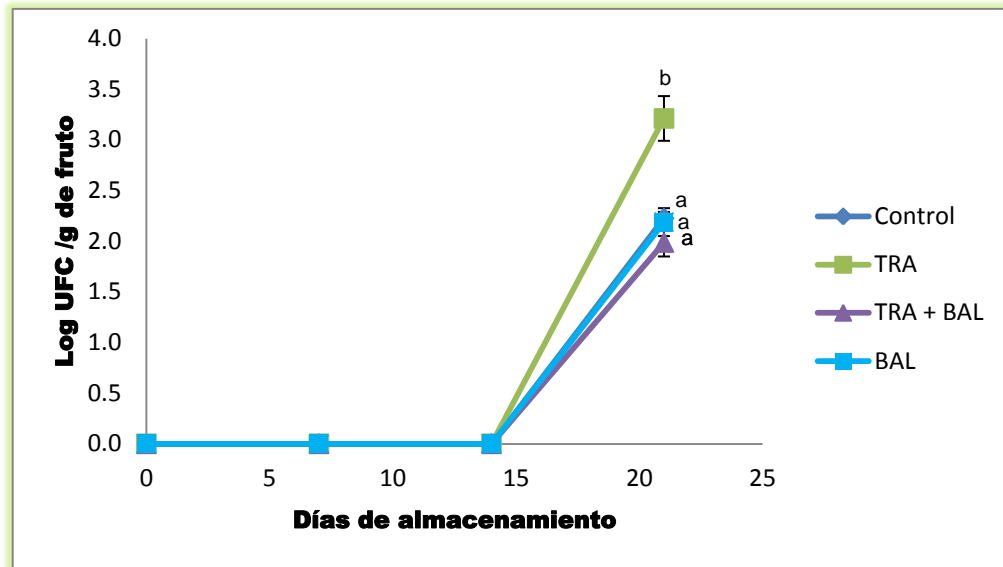


Figura 21. Crecimiento de Levaduras en frutos de litchi 'Brewster' almacenado a $11 \pm 1^\circ\text{C}$ y $92 \pm 2\%\text{HR}$ por 21 días. Media de 3 repeticiones \pm DE. Letras diferentes denotan diferencia significativa.

9. CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que la aplicación de TRA a concentraciones de 0.28- 10% (p/v) no tuvo efecto en el crecimiento *in vitro* de BAL. Asimismo, en el bioensayo con frutos, la TRA no actuó como prebiótico de la BAL ya que la cuenta de UFC/g de fruto no incrementó en presencia de este disacárido. Los frutos tratados con BAL conservaron una cuenta constante al final del almacenamiento aun cuando la refrigeración no es ideal para su crecimiento.

La TRA permitió conservar mejor el cociente SST/AT y el color (C^* y h) de los frutos a los 14 días de almacenamiento. Asimismo, los frutos tratados con BAL mantuvieron una concentración de antocianinas totales similar a la inicial y diferente significativamente del control, el cual tuvo la menor concentración; este resultado concuerda con los valores de C^* y h que indican un color rojo al final del almacenamiento y con el bajo porcentaje de compuestos poliméricos encontrado. Sin embargo, el efecto positivo de la TRA y de la BAL sobre las variables mencionadas de calidad no fue de suficiente magnitud para que estos tratamientos sean interés comercial.

Los frutos tratados con SO_2 mantuvieron concentraciones altas de antocianinas, aún mayores que las obtenidas en los frutos tratados con BAL. Este tratamiento también mostró un menor porcentaje de compuestos poliméricos en la cáscara de los litchis.

La lipoperoxidación de las membranas celulares de los frutos tratados con la TRA y el SO_2 fue mayor que en los litchis control probablemente debido al estrés ocasionado por los tratamientos. Las concentraciones de MDA encontradas en el pericarpio de los litchis tratados con la TRA y el SO_2 fueron bajas comparadas con los reportes de otros autores, probablemente debido a diferencias en variedad, tipo de almacenamiento y tratamiento poscosecha aplicado.

Se puede concluir entonces que la TRA no tiene efecto en el crecimiento de BAL y su efecto en la conservación poscosecha de litchi 'Brewster' (manejado con buenas prácticas agrícolas) es limitado.

El buen control de la temperatura de $11 \pm 1^\circ\text{C}$, la humedad relativa alta ($92 \pm 2\%$) que se mantuvo en el frigorífico y la buena calidad del fruto (indicada por el hecho de que los litchis control mostraron una calidad aceptable al final del almacenamiento) influyeron positivamente en los resultados.

10. PERSPECTIVAS

Se observó un efecto de *Lactobacillus plantarum* sobre la concentración de antocianinas, manteniéndose un color rojo por 21 días de almacenamiento; sin embargo no son suficientes los resultados obtenidos para implementar su aplicación a escala comercial.

Es necesario ofrecer otras alternativas a los productores de litchi 'Brewster' que permitan mantener los parámetros de calidad aceptables para su comercialización. Algunas alternativas que han sido empleadas en otros países para la conservación poscosecha de frutos son los choques térmicos, los impulsos eléctricos o los campos magnéticos y aún no se tienen reportes sobre su empleo en litchi.

11. BIBLIOGRAFÍA

Akamine, E.K., 1960. Preventing the darkening of fresh lychees prepared for transport. Tech. Rep. 27, Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii. pp. 3-17.

Andersson, U., Radstrom, P. 2002. β -Glucose-1-phosphate- interconverting enzymes in maltose- and trehalose- fermenting lactic bacteria. *Environmental Microbiology*, 4, 81-88.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Second Edition. (Salminen, S. Wright, A. Ed.) p.p 1-72. Marcel Dekker, Inc.

Bianchi, G., Gamba, A., Limiroli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salami, F y Bartels, D. 1993. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum*, 87,223-226.

Bashiti-El, T., Hamamci, H., Oktem, H., Yucel, M. 2005. Biochemical analysis of TRA and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science*, 169, 47-54.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, Ma.L., Paéz-Hernández, Ma.E., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Castillo-Animas D., Chatelain-Mercado S., Jacuinde-Guzmán, J., Rivera-Cabrera, F., Pelayo –Zaldívar, C. 2006. Tabla de color para la cosecha de litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) CV Brewster. Documento técnico elaborado para el Consejo Nacional de Productores y Exportadores de Litchi A. C. (CONPELAC).

Castillo-Animas D., Pelayo-Zaldívar, C. 2006. Índice de cosecha para litchi (*Litchi sinensis* Sonn) CV Brewster. Documento técnico elaborado para el Consejo Nacional de Productores y Exportadores de Litchi A. C. (CONPELAC).

Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. 2010. Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 431-435.

Chen, Y., Sriornual, S., Onda, T., Yanagida, F. 2007. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 45, 190-193.

Crowe L. M. 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 131, 505-513.

De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., De Vos, W.M. 2006. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.

Del Valle- Leuizamón, G., González-León, A., Báez-Sañudo, R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis Vinifera*L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana, Sociedad Mexicana de Fitotecnia, A.C. Chapingo, México*, 28, 359-368.

Dicko, H., Gruppen, H., Traoré, A., Voragen, A. y Berkel, W. 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 21-38.

Duan, X., Jiang, Y., Su, X., Zhang, Z., Shi, J. 2007. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. *Food Chemistry*, 101, 1365-1371.

Duan, X., Liu, T., Zhang, D., Su X., Lin, H., Jiang, Y. 2010. Effect pure oxygen atmosphere on antioxidant activity of harvested litchi fruit during storage. *Food Research International*, Article in press.

Fennema, O. 2000. *Química de los alimentos* 2da. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España, 1243.

Fu, W., Mathews, A.P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 163-170.

Furuki T., Akira K., Minoru S. 2005. De and rehydration behavior of alpha-alpha-trehalose dehydrate under humidity-controlled atmospheres. *Carbohydrate Research*, 340, 429-438.

Galán, S.V. 1987. El litchi y su cultivo. Estudio FAO producción y protección vegetal 83. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. p.p. 1-21.

Goddijn, O., Smeeckens, S.1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. The Plant Journal, 14, 143-146.

Higashiyama, T. 2002. Novel functions and applications of trehalose. Pure applications Chemical, 74, 1263-1269.

Holcroft M. D., Mitcham J. E.1996. Postharvest physiology and handling of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Postharvest Biology and Technology, 9, 265-281.

Ingram, M. 1975. The Lactic acid bacteria- A broad view. En: Fourth Long Asthon Symposium (Carr, J.G., Cutting.C.V., Whiting, C.G Ed.) p.p 3-6. Academic Press Inc. London.

International Commission on Microbiological Ecology of Food Commodities (ICMSF) 1998. Microorganismos in Foods 6. Microbial and Ecology of Food Commodities, p.p 201-228.

Jacuinde, K., 2007. Efecto de distintas tecnologías en la conservación poscosecha del litchi (*Litchi chinensis* Sonn "Brewster"). Tesis de Maestría en Ciencias del postgrado en recursos genéticos y productividad. Fruticultura. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Texcoco, Estado de México.

Jacques, J., Caro, Y., Noelle Ducamp, M., Reynes, M.2005. Postharvest control of pericarp browning of litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn cv Kwaî Mi) by treatment with chitosanand organic acids I. Effect of pH and pericarp dehydration. Postharvest Biology and Technology, 38,128-136.

Jiang, Y.M., Fu, J.R.1999. Postharvest browning of litchi fruit by water loss and its prevention by controlled atmosphere storage at high relative humidity. Lebensmittel.-Wissencht.und-Technology, 32,278-283.

Jiang, Y.M., Zhu, R.X., Li, B.Y.2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. Lebensmittel.-Wissencht.und-Technology, 34, 430-436.

Jiang, Y., Duan, Duan, Joyce, D., Zhang, Z., Li, J. 2004. Advances in understanding of enzymatic browning in harvest litchi fruit. *Food Chemistry*, 88, 443-446.

Kaiser, C., Levine J., Wolstenholme B.N. 1995. Vapour heat and low pH dips improve litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp colour retention. *Journal of South African Society for Horticultural Science*, 5, 7-10.

Komes D., Lovric T., Kovacevic-Ganic K., Gajdos-Kljusuric J., Banovic M. 2005. Trehalose improves flavour retention in dehydrated apricot pure. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 425-435.

Konica Minolta, 2011. Parte I. Comunicación precisa de los colores L*a*b*. <http://www2.konicaminolta.eu/eu/Measuring/pcc/es/part1/07.html>; 11 julio 2011.

Lücke, K. 1995. Indigenous lactic acid bacteria of various food commodities and factors affecting their growth and survival. En: *Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*. (Faruk, T., Bibek, R. Ed.) p.p 257-265. Springer.

Li, X., Chen, X. 2009. Drying of micro-encapsulated lactic acid bacteria – Effects of trehalose and immobilization on cell survival and release properties. *Journal Ocean University China*, 8, 39-44.

Lee, H.S., Wicker, L., 1991. Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 40, 263-270.

Amnon, L., Dvir, O., Rot, L., Akerman, M., Regev, R., Wiesblum, A., Fallik, E., Zauberman, G., Fuchs, Y. 2000. Hot water brushing: an alternative method to SO₂ fumigation for color retention of litchi fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 18, 235-244.

Martínez-Castellanos, G. 2009. Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha de litchi y rambután. Tesis de Doctorado en Biotecnología. DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México D.F., 104.

Martínez-Castellanos G., Pelayo-Zaldívar, C., Pérez-Flores, L.J., López-Luna, A., Gimeno, M., Bárzana, E., Shirai, K. 2011. Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)

quality and preservation by *Lactobacillus plantarum*. Postharvest Biology and Technology, 59, 172-178.

Neog, M., Saikia, L. 2010. Control of post-harvest pericarp browning of litchi (*Litchi chinensis* Sonn). Journal of Food Science and Technology, 47, 100-104.

Oren-Shamir, M. 2009. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plantas?. Plant Science, 177, 310-316.

Ouwehand, A. 1998. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Funtional aspects. Second Edition. (Salminen, S. Wright, A. Ed.) p.p 139- 153

Pang, X., Zhang, Z.,Duan, Z., Ji, Z. 2001. Influence of pH and active oxygen on the stability of anthocyanins from litchi pericarp. International Society of Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturae 558: I International Symposium on Litchi and Longan.

Patist A., Zoerb H. 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 40, 107-113.

Penna S. 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. Trends in Plant Sciences, 8, 355-357.

Quirasgo, B.M., López-Munguía C.A. 2006. Enzimas. En: Química de los alimentos. Cuarta edición. Person Addison Wesley., México, D.F. (Badui, D.S. Ed.) p. p 345-352.

Rivera, F. 2005. Parámetros indicadores de inducción y protección al daño por frío (DPF) en frutos de limón "Mexicano" (*Citrus aurantifolia* S.) Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud. DCBS. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México D.F., 317.

Rivera-López, J., Ordorica-Falomir, C., Wesche-Ebeling, P. 1999. Changes in anthocyanin concentration in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during maturation. Food Chemistry, 65, 195-200.

Rodríguez-Verástegui, L.L., Castillo-Animas, D., Chatelain-Mercado, S., Pelayo – Zaldívar,C. 2009. Tratamiento con dióxido de azufre (SO₂) y TRA para la conservación del color rojo del litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) CV Brewster. Convenio COVIA-CONPELAC

(Consejo Nacional de Productores y Exportadores de Litchi A. C.). Vigencia: 20 enero–31 agosto 2009.

Roser B. 1991. Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science and Technology*, 2,166-169.

Schiraldi, C., Di Lernia I., De Rosa M. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 20, 420-425.

Scott K.J., Brown, B.I., Chaplin, G.R., Wilcox, M.E., Bain, J.M. 1982. The control of rotting and browning of litchi fruits by hot benomyl and plastic film. *Scientia Horticulturae*, 16, 253-262.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2009. Agricultura. Producción Anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 ,20 junio 2011.

Sivakumar D., Korsten L., Zeeman K. 2007. Postharvest management on quality retention of litchi during storage. *Fresh Produce*, Global Sciences Books, 1, 66-75.

Tang, M., Waring,A., Hong,M. 2007. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. *Journal of Magnetic Resonance*, 184, 222-227.

Tseng, C-P., Montville, T.J 1990. Enzyme activities affecting product distribution by *Lactobacillus plantarum* in response to changes in pH and O₂. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 2761-2763.

Toivonen, P., Brummell, D. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1-14.

Torskangerpoll, K., Anderser, M. 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89, 427-440.

Underhill S.J.R. and Wong L.S., 1990. A maturity standard for lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Acta Horticulturae*, 269, 181-187.

Underhill, S.J.R., Critchley, C. 1995. Cellular localization of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis* Sonn. Pericarp. Australian Journal of Plant Physiology, 22, 667-632.

Waldir, E., Rynchtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., Egoavil, E. 2007. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Revista Peruana de Biología, 14, 271-275.

Wingler A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. Phytochemistry, 60, 437-440.

Wrolstad, R. 1976. Color and pigment analyses in fruit products. Agricultural Experiment Station Oregon State University, Corvallis. Boletín 6241-15.

Yi, C., Jiang, Y., Shi, J., Qu, H., Duan, X., Yang, B. 2009. Effect of adenosine triphosphate on changes of fatty acids in harvested litchi fruit infected by *Peronophythora litchi*. Postharvest Biology and Technology, 54, 159-164.

Zhang, Z., Pang, X., Xuwu, D., Ji, Zuoliang, J., Jiang, Y. 2005. [Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp](#). Food Chemistry, 90, 47-52.

Zhang, Z., Pang, X., Ji, Z., Jiang, Y. 2001. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. Food Chemistry, 75, 217-221.

Zheng, X., Tian, S. 2006. Effect of oxalic acid on control of postharvest browning litchi fruit. Food Chemistry, 96, 519-523.

Zauberman G., Ronen R., Akerman M., Fuchs Y. 1989. Low pH treatment protects litchi fruit colour. Acta Horticultural, 269, 309-314.

Zenteno, S. T., Saldaña, B.Y. 2008. Daño a lípidos. En: radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. (Konigsberg, F.M. Ed.) p.p 135-145. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V

12. APÉNDICE

Las antocianinas son compuestos solubles en agua que confieren colores que van desde anaranjados, rojos, azules y púrpuras a frutos, flores y hojas de las plantas. Se sintetizan a partir de la conversión de los precursores fenilalanina y acetato, vía el metabolismo del fenil propanoide (Del Valle-Leguizamón, 2005; Casteña-Ovando, 2009).

La estructura básica de las antocianinas son las antocianidinas a las que también se les conoce como agliconas. La estructura de la antocianidina es llamado grupo flavilio el cual consiste, en un anillo aromático (A) que se encuentra unido a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno (C), éste a su vez se une a un tercer anillo aromático (B) por medio de un enlace C-C (Fig. 22).

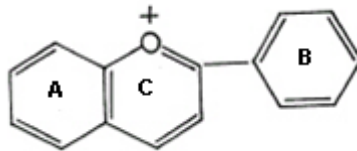


Figura 22. Estructura de la antocianidina (Del Valle-Leguizamón, 2005).

Las antocianinas se sintetizan en el citoplasma y se cree que son transportadas a las vacuolas por una glutatión S transferasa. Pertenecen al grupo complejo de los compuestos fenólicos y su función se asocia con la coloración de la fruta y con la protección al estrés lumínico como parte del sistema antioxidante. Tienen la capacidad de neutralizar los efectos de los radicales libres o disipar energía cuando otros sistemas detoxificantes han sido superados en condiciones graves de estrés. (Oren-Shamir, 2009).

La estabilidad de las mismas se ve afectada por los cambios de pH en la vacuola y esto permite el cambio en la coloración de las mismas. Las antocianidinas son compuestos lábiles que al ser glucosiladas (glucosa, rutinosa, ramnosa, etc.), aciladas o metiladas se vuelven más estables evitando la degradación inmediata por enzimas como la PPO y POD. Existen alrededor de 500 antocianinas de las cuales solo son seis las más comunes en plantas vasculares (Fig. 23).

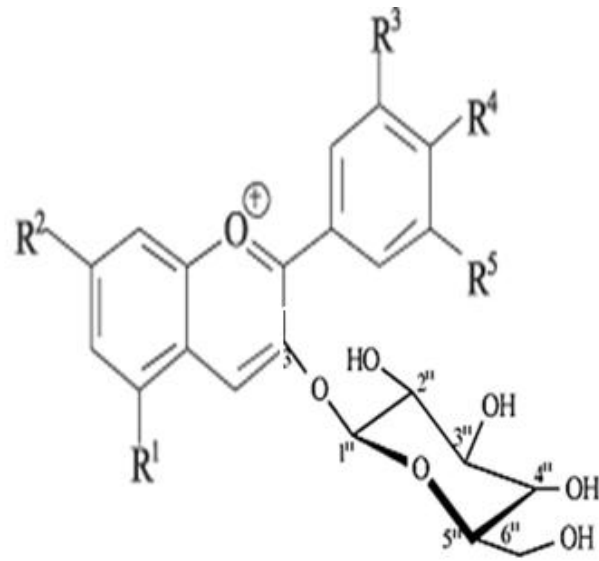


Figura 23. Estructura de una antocianina (Del Valle-Leguizamón, 2005).

La estabilidad de las antocianinas se ve influenciada por los cambios de pH (Fig. 22). A pH 1, conocida también como la forma flavilium (color rojo) predominan las especies rojas y púrpuras, a pH entre 2 y 4 predominan la base quinoidal (color azul), a pH de 5 a 6 predomina la forma carbinol (sin color) y a pH mayores hay degradación de antocianinas (Fig. 24)

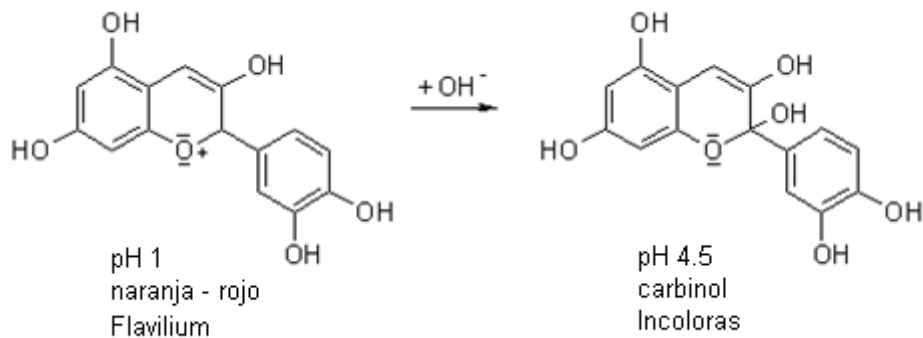
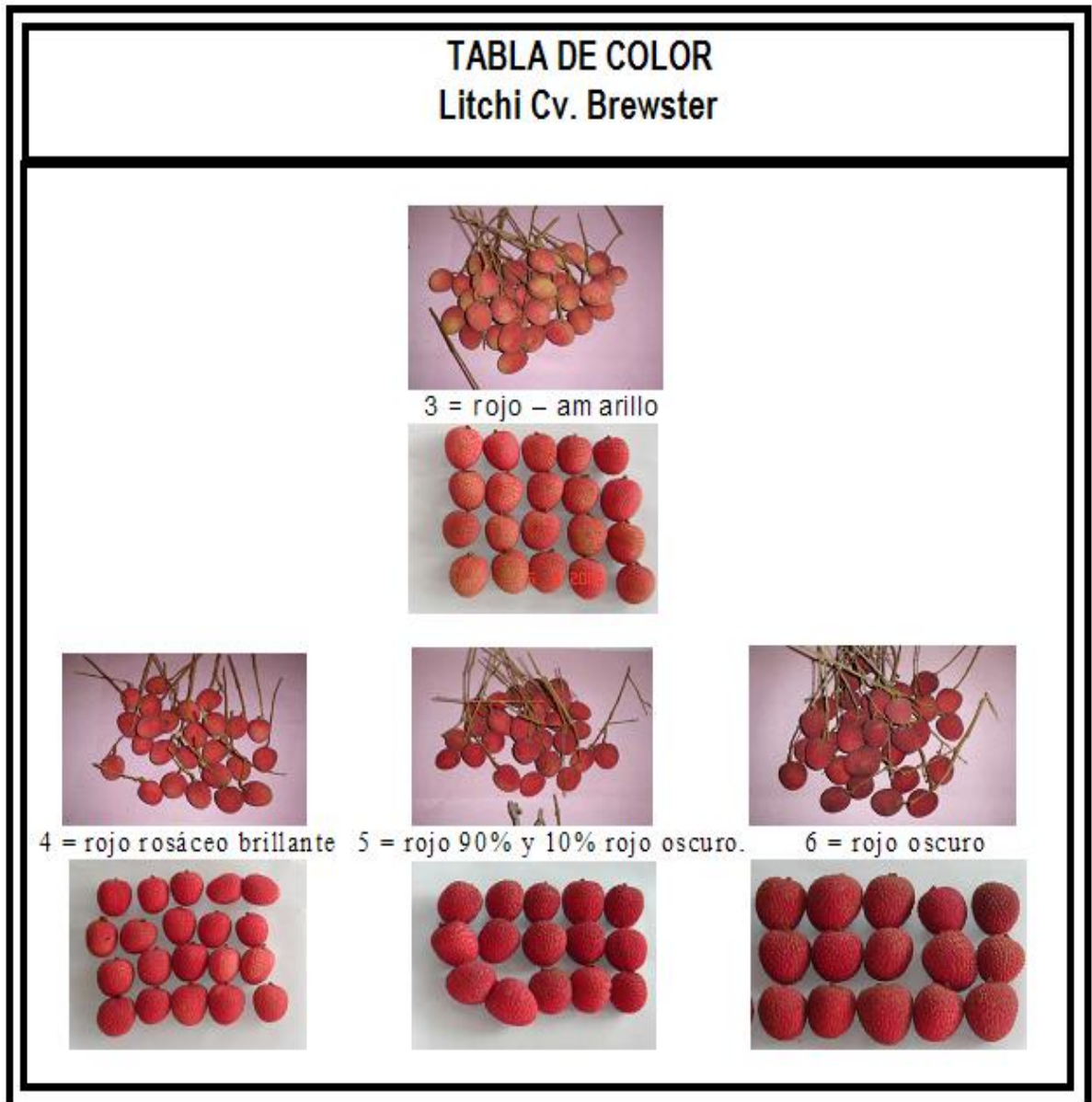


Figura 24. Cambio estructural de las antocianinas con el cambio de pH (Del Valle-Leguizamón, 2005).

13. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de color CONPELAC.



México D.F. a 3 de Agosto del 2011.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Uso de trealosa y *Lactobacillus plantarum* para la conservación poscosecha de litchi (*Litchi chinensis* Sonn. var Brewster)”

que presentó

I.A. Lizette Liliana Rodríguez Verástegui


Comité Tutorial:

Directora: Dra. Clara Pelayo Zaldívar


Asesora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesora: Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Jurado:

Presidente: 


Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Secretario: 

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: 

Dra. Mónica Ponce Valadez

Vocal: 

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez