

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

Interacción sorbatos-levaduras en alimentos: modelización de su efecto en medio sólido, biología molecular y detección de su transformación en 1, 3-Pentadieno por MWIR

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva María Rivas Fernández

Directores

José Martínez Peinado
Pilar Barreiro Elorza
María Isabel de Silóniz Jiménez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



INTERACCIÓN SORBATOS-LEVADURAS EN ALIMENTOS:
MODELIZACIÓN DE SU EFECTO EN MEDIO SÓLIDO,
BIOLOGÍA MOLECULAR Y DETECCIÓN DE SU
TRANSFORMACIÓN EN 1,3-PENTADIENO POR MWIR

TESIS DOCTORAL

EVA MARÍA RIVAS FERNÁNDEZ

MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III

INTERACCIÓN SORBATOS-LEVADURAS EN ALIMENTOS:
MODELIZACIÓN DE SU EFECTO EN MEDIO SÓLIDO,
BIOLOGÍA MOLECULAR Y DETECCIÓN DE SU
TRANSFORMACIÓN EN 1,3-PENTADIENO POR MWIR

Tesis doctoral presentada por
Eva María Rivas Fernández
para optar al grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

V° B° de los Directores:

Dr. José Martínez Peinado

Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid

Dra. Pilar Barreiro Elorza

Catedrática de la Universidad Politécnica de Madrid

Dra. María Isabel de Silóniz Jiménez

Profesora titular de la Universidad Complutense de Madrid

MADRID, 2017

La alegría de ver y entender
es el don más perfecto de la naturaleza
Albert Einstein (1879-1955)

Dedicada a mi familia
y a Roberto

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Campus de Excelencia Internacional de Moncloa la concesión la beca predoctoral PICATA con la que ha sido posible la realización de esta Tesis. Siempre estaré eternamente agradecida por haberme dado una oportunidad laboral en una época en la que escaseaban. Sin embargo, esta concesión nunca habría tenido lugar sin la insistencia de la Dra. María Isabel de Silóniz y la idea de “consultar el correo” de la Dra. Pilar Barreiro Elorza. Muchas gracias.

Todavía me acuerdo de cuando subí al departamento de Microbiología III impulsada y recomendada por mi amiga Marta en busca de una oportunidad de colaboración en el grupo de la Dra. María Isabel de Silóniz. Muchísimas gracias Marta por insistir en que lo hiciera y Maribel, gracias por acogerme, confiar en mí para trabajar en tu grupo, enseñarme y formarme en el mundo de la ciencia. Sin tu aprecio, motivación, dedicación y ayuda constante, todo hubiera sido mucho más difícil o no hubiera sido. No creo que vuelva a encontrar una “jefa” tan mami como tú. Gracias también a mis otros dos directores de Tesis, la Dra. Pilar Barreiro Elorza y el Dr. José Martínez Peinado. Aunque inicialmente me daban miedo tus ideas Pilar, lo cierto es que al final he aprendido mucho con ellas. Gracias por mostrarme tu gran inteligencia y por tu visión de que la perfección es enemigo de lo bueno. Pepe, gracias por tu experiencia, conocimientos, capacidad para enlazar todo y sobre todo tus palabras motivadoras y los miles de correos solucionándome dudas durante la última fase de escritura. Creo que los tres habéis confiado mucho más en mí que yo misma y gracias a eso he llegado hasta aquí. Gracias por vuestra paciencia. No sé si algún día me encontraré tan a gusto en un trabajo como lo he estado con vosotros. Os aprecio mucho a los tres.

Muchas gracias a la profesora Isabel Sá-Correia por aceptarme en su grupo del Instituto Superior Técnico de Lisboa y a todas las personas que trabajaban en sus laboratorios, en especial a Margarida, Joana y Claudia. Aprendí muchísimo con vosotras e hicisteis de mi estancia en Lisboa una de las mejores experiencias que he tenido. Gracias a la empresa NIT por ayudarnos con nuestras dudas sobre el detector MWIR y con el soporte informático de los espectros. Gracias también al departamento de Biomatemática por sus análisis estadísticos y al CAI de Espectrometría de Masas de la Universidad Complutense por los análisis de GC-MS.

Gracias a todas las personas que han ido pasando por el laboratorio 15 desde que entré a formar parte de él. Gracias a las “Irenes”, Adrián y sobre todo Julian, Ginna, Jessenia y Antoñito, mis

colombianos y paraguayo favoritos. Hicisteis que los primeros años en de laboratorio fueran inolvidables y, aunque nos separe un océano de por medio, espero volver a veros algún día. La súper mami Elena, qué decirte...mi compañera auténtica, me llevo una amiga de verdad que me entiende en todo. Gracias por aguantarme y ayudarme en tantas cosas personales y del laboratorio. Gracias a todos los becarios del departamento de Microbiología III, a Patricia, a Nacho, a las chicas del 7, en especial a Jéssica, el mejor de los ejemplos para mí como científica y Petra, mi compi también del 15, gracias por solucionar muchas dudas y ayudarme con tantas cosas de esta Tesis. A María José por ayudarme a que alguien me contestara a mi correo de búsqueda de estancia. A todas las "millonarias", gracias por los ratos agradables durante las comidas en la biblioteca. De la politécnica gracias a Eva Cristina y Belén por vuestra calma y ayuda, a Blanca por los muchos papeles firmados que me has conseguido y a mi química favorita María, por solucionar tantas dudas de química y por ser mi compañera y apoyo con el aparato.

Gracias a mi amiga María por animarme también a meterme en el mundo de la ciencia, algún día tú también lo conseguirás. A Iciar, la primera doctora-funcionaria del grupo, ojalá me vaya tan bien como a ti, gracias por tu ayuda con el inglés. A mis "Bios", me costó al principio seguir en la facultad sin teneros por aquí, gracias por haberme hecho tan divertido estudiar Biología y gracias por todos vuestros ánimos. Gracias a mis "Niñas de casi y 30 años" y en especial a mí Almu, que siempre me apoya con sus palabras de "te va a salir bien". A mis compañeras de biblioteca, Palo, Celi y Cris, por permitir que me concentrara tanto "mirando durante horas" las hojas de Excel.

Dar las gracias a toda mi familia, a mis padres, a mis hermanos, a mis primas y a mis tíos, por cuidarme, mantenerme, aguantarme y porque, sin saber exactamente qué es lo que hacía en el laboratorio, han confiado en que el tener que "cuidar y contar bichos", a la larga sería algo bueno para mí. Espero que estéis orgullosos. A mis sobrinas, que han ido apareciendo en mi vida en paralelo al transcurso de esta Tesis y ser su "tía Veva" es genial y muy gratificante. Y por último, el que más ha sufrido las decepciones y alegrías de esta Tesis, Rober. Gracias por escucharme, por aguantarme, por tu apoyo, por tus consejos, y por "mantenerme" en esta última etapa. Superado ésto, superaremos todo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	7
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	13
INTRODUCCIÓN GENERAL	17
1. Levaduras como agentes deteriorantes de alimentos	19
1.1 Levaduras alterantes	19
1.2 Características del alimento para el deterioro por levaduras.....	21
1.3 Importancia del deterioro por levaduras	22
1.4 Tipos de deterioro	24
1.5 Mecanismos para prevenir el deterioro.....	25
2. El ácido sórbico y los sorbatos	28
2.1 Aplicaciones de los sorbatos en alimentos	28
2.2 Acción antimicrobiana de los sorbatos	30
2.3 Mecanismos propuestos de resistencia a sorbatos	34
3. Principales signos de deterioro de alimentos	40
3.1 Malos olores y sabores en alimentos	40
3.2 Hinchamiento o producción de CO ₂	42
4. Modelos predictivos de crecimiento.....	44
4.1 Tipos de modelos	45
4.2 Modelos primarios	46
4.3 Modelos secundarios y terciarios.....	54
OBJETIVOS	57
CAPÍTULO 1: Modelización del crecimiento superficial de levaduras sobre medios sólidos y su aplicación al efecto inhibitor del sorbato potásico	61
INTRODUCCIÓN	63
1. Modelización y crecimiento microbiano sobre estructuras sólidas.....	63
1.1 Estructura del alimento y su influencia en el crecimiento microbiano.....	63
1.2 Modelos de crecimiento en medio sólido.....	65
2. Técnicas de estudio de crecimiento de colonias en medio sólido	72
2.1 Análisis de imagen.....	73

MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
1. Cepas utilizadas y ecuaciones DO_{620} Vs UFC/ml.....	76
2. Medio líquido	77
2.1 Obtención de inóculos.....	77
2.2 Análisis del crecimiento en medio líquido	77
3. Medio sólido.....	78
3.1 Obtención de inóculos y condiciones de crecimiento.....	78
3.2 Determinación del crecimiento de levaduras en medio sólido	79
3.3 Análisis del crecimiento de colonias de levadura a distintos valores de pHs y en presencia de sorbato potásico	82
RESULTADOS.....	84
1. Análisis del crecimiento de UFC de levaduras en medio sólido (YMA) y líquido (YMB)	84
1.1 Comparación del crecimiento de UFC de levaduras en medio sólido y en medio líquido.....	84
1.2 Análisis del crecimiento de UFC dentro de la colonia en YMA.....	87
2. Desarrollo de un algoritmo de análisis de imagen para medir el crecimiento de levaduras en medio sólido	92
3. Análisis de la cinética de crecimiento superficial de la colonia	95
3.1 Radio.....	96
3.2 Área	100
3.3 Validación: ajuste del modelo a los datos de Gray y Kirwan, (1974)	102
4. Relación entre el número total de células de la colonia y su tamaño a lo largo del tiempo: el coeficiente superficie-celular, C_s	104
5. Análisis del crecimiento de colonias de levadura a distintos valores de pHs y en presencia de sorbato potásico.....	107
DISCUSIÓN	112
1. Comparación de la cinética de crecimiento celular en medio líquido y sólido.....	112
2. Análisis del crecimiento superficial de las colonias a lo largo del tiempo: radio y área ...	115
3. Propiedades relevantes de la ecuación de Gompertz en modelos del crecimiento de colonias de levaduras.....	120
4. Aplicación de los modelos de crecimiento de las colonias al crecimiento en presencia de sorbato potásico a diferentes pHs	121
CAPÍTULO 2: Biología molecular de la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos por levaduras	127
INTRODUCCIÓN	129
1. Microorganismos responsables de la producción de 1,3-pentadieno y alimentos donde se genera	129

2. Sistema de descarboxilación	130
MATERIAL Y MÉTODOS.....	134
1. Estudio de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de levadura de diferentes especies	134
1.1 Microorganismos utilizados y métodos de conservación	134
1.2 Medios e inóculos empleados.....	134
1.3 Detección de 1,3-pentadieno.....	135
2. Estudio molecular de la producción de 1,3-pentadieno en las levaduras <i>D. hansenii</i> y <i>Z. rouxii</i>	136
2.1 Gen <i>PAD1</i>	136
2.2 Gen <i>FDC1</i>	141
3. Desarrollo de un protocolo de PCR para la discriminación de cepas productoras de 1,3-pentadieno en <i>D. hansenii</i>	141
RESULTADOS.....	143
1. Producción de 1,3-pentadieno.....	143
2. Estudio del gen <i>PAD1</i> en <i>D. hansenii</i> y <i>Z. rouxii</i>	146
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i>	146
2.2 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	151
2.3 Análisis comparativo de la proteína Pad1 de diferentes especies.....	152
3. Estudio del gen <i>FDC1</i> en <i>D. hansenii</i> y <i>Z. rouxii</i>	155
3.1 <i>Debaryomyces hansenii</i>	155
3.2 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	161
3.3 Análisis comparativo de la proteína Fdc1 de diferentes especies	163
4. Desarrollo de un método molecular para la detección de cepas productoras de 1,3-pentadieno	166
DISCUSIÓN	168
CAPÍTULO 3: Utilización de tecnología MWIR para la detección de la capacidad deteriorante de levaduras por producción de 1,3-pentadieno y CO₂	179
INTRODUCCIÓN	181
1. Cromatografía de gases.....	182
1.1 Cromatografía de Gases-Olfatometría.....	183
1.2 Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (GC-MS).....	183
2. Narices electrónicas o sensores químicos de gases.....	184
2.1 Tipos de sensores y procesamiento de la señal-reconocimiento de patrones.....	185
2.2 Aplicaciones.....	186
3. Espectroscopía de infrarrojos.....	188

3.1 Aplicaciones NIR y MIR.....	190
3.2 MWIR.....	193
MATERIAL Y MÉTODOS.....	197
1. Espectrómetro MWIR.....	197
2. Ensayos con compuestos patrón puros	198
2.1 Ensayo de compuestos en fase líquida	198
2.2 Ensayo de compuestos en fase gaseosa	199
3. Ensayos con cultivos celulares de levaduras.....	200
4. Análisis de espectros	201
4.1 Identificación del ancho de la banda de absorción.....	202
4.2 Análisis no supervisado	203
4.3 Análisis supervisado	205
RESULTADOS.....	207
1. Comparación del ancho de las bandas de absorción	207
2. Análisis no supervisado de los espectros dinámicos MWIR.....	210
2.1 Análisis de componentes principales	210
2.2 Ajuste de primer orden de la dinámica de respuesta de los PCs	212
2.3 Análisis de clúster	214
3. Análisis supervisado de los espectros dinámicos MWIR.....	216
3.1 Análisis discriminante.....	216
DISCUSIÓN	219
DISCUSIÓN GENERAL.....	227
CONCLUSIONES	235
BIBLIOGRAFÍA	241

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μ	Tasa específica de crecimiento
μ_0	Tasa específica de crecimiento a tiempo 0/en fase exponencial/ en ausencia de conservante
μ_{exp}	Tasa específica de crecimiento en fase exponencial
μ_i	Tasa específica de crecimiento en el punto de inflexión de la curva
	Tasa o velocidad a la cual decrece exponencialmente μ desde μ_0
μ_{max}	Tasa específica de crecimiento máxima
λ	Tiempo de latencia
a	Señal de estabilización o nivel máximo de intensidad
A	Área
A_0	Área a tiempo 0
A_{exp}	Área experimental
A_{max}	Área máxima
Acc.	<i>Accuracy Factor</i> o Factor de exactitud
<i>ACT1</i>	Gen de síntesis de actina
ANOVA	Análisis de la varianza
APPC	Análisis de peligros y puntos críticos
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BLASTn	Herramienta para la búsqueda de similitud con bases de datos nucleotídicas
Bias	<i>Bias Factor</i> o Factor de sesgo
BSA	Seroalbúmina bovina
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> (Colección de cultivos fúngicos)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Col	Colonia
C_s	Coefficiente superficial o coeficiente superficie-celular (Células/mm ²)
C_t	Ciclos necesarios para alcanzar la señal umbral de fluorescencia
D.	<i>Debaryomyces</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos
DMAP	Dimetilalil monofosfato
DMFit	Programa para modelizar datos según distintos modelos
DO	Densidad óptica
E-200, E-201,	Ácido sórbico, sorbato sódico
E-202, E-203	Sorbato potásico, sorbato cálcico
F	Estadístico F de Fisher
FPA	Matriz de detectores de plano focal
FT-MIR	Espectroscopía de infrarrojo medio con Transformada de Fourier
<i>FDC1</i>	Gen que codifica la proteína Fdc1p: <i>Ferulic Acid Decarboxylase</i>
<i>ZrFDC1</i>	Gen de <i>Z. rouxii</i> (Zr) homólogo al gen <i>FDC1</i> de <i>S. cerevisiae</i>

<i>DhFDC1</i>	Gen de <i>D. hansenii</i> (Dh) homólogo al gen <i>FDC1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
FMN	Mononucleótido de flavina
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC-O	Cromatografía de gases con detector olfatométrico
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GRAS	<i>Generally Considered As Safe</i>
ICSC	<i>International Chemical Safety Card</i>
IR	Infrarrojo
<i>Ka</i>	Tasa de crecimiento lineal del cuadrado del radio
Kb	Kilobase de nucleótidos
<i>Kr</i>	Tasa de crecimiento lineal del radio
<i>Kw</i>	Concentración de ácido débil a la que la mitad de la tasa de consumo de sustrato se desvía a mantenimiento celular
Lag	Tiempo de latencia
LDA	Análisis discriminante lineal
Ln	Logaritmo neperiano
Log	Logaritmo decimal
LVF	Filtro lineal variable
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry - Time Of Flight</i>
mM	Milimolar
m/z	Relación masa/carga
MIR	Infrarrojo medio (2500-25000 nm; 2,5-25 μm),
MWIR	Infrarrojo medio de banda media (3000-5000 nm; 3-5 μm)
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	No determinado
NIR	Infrarrojo cercano (700-2500 nm; 0,7-2,5 μm)
NP	Cepas no productoras de 1,3-pentadieno
NTC	<i>No Template Control</i> en RT-PCR
N_0, N_{v_0}	Inóculo inicial celular de la población
$N(t)$	Número de células viables en el momento t
Nt	Número de células totales
Nt_{exp}	Número de células totales experimental
Nt_{max}	Número máximo de células totales
N_{max}	Población máxima que se alcanza
Nv	Número de células viables o UFC
Nv_{max}	Número máximo de UFC
O.	Orden Ministerial
P	Cepas productoras de 1,3-pentadieno
<i>PAD1</i>	Gen que codifica la proteína Pad1p: <i>Phenylacrylic Acid Decarboxylase</i>
<i>ZrPAD1</i>	Gen de <i>Z. rouxii</i> (Zr) homólogo al gen <i>PAD1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>DhPAD1</i>	Gen de <i>D. hansenii</i> (Dh) homólogo al gen <i>PAD1</i> de <i>S. cerevisiae</i>
pb	Pares de bases

PbSe	Seleniuro de plomo
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDC	Piruvato descarboxilasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
pK _a	Constante de disociación de un ácido
PLS_DA	Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales y análisis discriminante
POF	<i>Phenolic Off Flavor</i>
ppm	Partes por millón
p/v	Peso/volumen
<i>r</i>	Radio
<i>r</i> ₀	Radio a tiempo 0
<i>r</i> _{max}	Radio máximo
<i>r</i> ²	Cuadrado del radio
<i>r</i> ₀ ²	Cuadrado del radio a tiempo 0
R ²	Coefficiente de determinación múltiple
R.D.	Real Decreto
RMSE	Raíz del error cuadrático medio
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasas
rpm	Revoluciones por minuto
RT-	<i>Reverse Transcriptase minus</i> , control en RT-PCR sin transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
S.	<i>Saccharomyces</i>
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SK	Sorbato potásico
<i>t</i> ₀	Tiempo de transición entre la fase exponencial y la siguiente fase
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TAE	Tampón formado por Tris, acetato y EDTA.
U	Unidades
UbiX/UbiD	Proteínas implicadas en la síntesis de ubiquinonas en bacterias
UFC	Unidades formadoras de colonia
VOC	Compuesto volátil orgánico
v/v	Volumen/volumen
YMA	<i>Yeast Morphology Agar</i>
YMB	<i>Yeast Morphology Broth</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción general

	Página
Tabla 1. Especies de levaduras así como sus propiedades fisiológicas y los síntomas que desencadenan en los alimentos y bebidas que deterioran frecuentemente.	20
Tabla 2. Síntesis de los límites máximos permitidos de mohos y levaduras en alimentos recogidos en la legislación española y comunitaria.	23
Tabla 3. Principales tipos de deterioro ocasionados por levaduras en diferentes alimentos.	24
Tabla 4. Dosis máxima permitida de ácido sórbico/sorbatos en diferentes tipos de alimentos de acuerdo al Reglamento (CE) N° 1129/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo.	29
Tabla 5. Porcentaje de ácido sórbico disociado y sin disociar a diferentes pHs del medio.	32
Tabla 6. Comparación de la estructura de los derivados del ácido sórbico con la de los derivados obtenidos por la acción de microorganismos.	39
Tabla 7. Algunos ejemplos de la aplicación de la modelización por el modelo Logístico, el de Gompertz, el lineal trifásico de Buchanan y el modelo de Baranyi y Roberts.	49

Capítulo 1 Modelización del crecimiento superficial de levaduras sobre medios sólidos y su aplicación al efecto inhibidor del sorbato potásico

	Página
Tabla 1. Ejemplos de relaciones existentes entre diferentes parámetros de las colonias.	71
Tabla 2. Ejemplos de programas diseñados o software empleado para el análisis de imágenes de colonias.	74
Tabla 3. Ecuaciones resultantes de la relación entre la DO ₆₂₀ y el Log (UFC/ml) de cada una de las cepas.	76
Tabla 4. Ecuaciones que relacionan el Ln de la DO ₆₂₀ y el Ln del número de grupos celulares/ml de la suspensión de las colonias de cada una de las cepas.	80
Tabla 5. Tasa específica de crecimiento (μ) \pm su error estándar, valor R ² y error estándar del ajuste de los datos de crecimiento de UFC en líquido o en sólido al modelo de Baranyi y Roberts, (1994).	84
Tabla 6. Parámetros \pm error estándar de los dos modelos que describen el crecimiento de células viables en medios sólidos junto con sus ajustes.	88
Tabla 7. Comparación de los errores relativos medios de la medición manual, error medio de la predicción del algoritmo, así como la validación del ajuste en las cuatro especies de levaduras estudiadas.	94

Tabla 8. Ajustes de los diferentes modelos empleados para describir el crecimiento del radio de las colonias.	96
Tabla 9. Parámetros \pm error estándar del modelo de Gompertz de crecimiento del área colonial junto con sus ajustes.	100
Tabla 10. Valores comunes de los parámetros cinéticos de la ecuación de Gompertz para el área de cada especie.	102
Tabla 11. Ajuste del modelo de Gompertz de crecimiento del radio y área colonial aplicado a los datos de Gray y Kirwan, (1974).	103
Tabla 12. Validación de la utilización del área como parámetro indicador del número de células totales de la colonia.	106
Tabla 13. Parámetros \pm error estándar de los modelos que describen el crecimiento de colonias de diferentes levaduras creciendo con y sin sorbato potásico (SK) a pH 7 y 5,6.	107
Tabla 14. Parámetros \pm error estándar de los modelos que describen el crecimiento de colonias de otras cepas de levadura creciendo con y sin sorbato potásico (SK) a pH 5,6.	109
Tabla 15. Valores de $K_w \pm$ error típico en el crecimiento en medio sólido de todas las cepas estudiadas.	111

Capítulo 2

Biología molecular de la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos por levaduras

	Página
Tabla 1. Alimentos en los que se ha detectado la aparición de 1,3-pentadieno y microorganismos responsables.	130
Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación del gen <i>PAD1</i> en <i>D. hansenii</i> y <i>Z. rouxii</i> .	137
Tabla 3. Cebadores empleados para la RT-PCR del gen <i>DhPAD1</i> y su control <i>ACT1</i> , en <i>D. hansenii</i> .	139
Tabla 4. Cebadores empleados para la amplificación del gen <i>FDC1</i> en <i>D. hansenii</i> y <i>Z. rouxii</i> .	141
Tabla 5. Detección sensorial de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de <i>D. hansenii</i> con 0,75 g/L de sorbato potásico a pH 7 y 5,6.	143
Tabla 6. Comparación de los resultados de la detección sensorial y cromatográfica (GC-MS) del compuesto 1,3-pentadieno en cepas seleccionadas tras su cultivo.	144
Tabla 7. Detección sensorial de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de <i>D. hansenii</i> .	145
Tabla 8. Detección sensorial de 1,3-pentadieno en cepas de otras especies de levadura.	146
Tabla 9. Polimorfismos de nucleótidos en el gen <i>DhPAD1</i> que producen cambio o no de aminoácido en la secuencia proteica deducida del mismo.	148

Tabla 10. Polimorfismos de nucleótidos en el gen <i>DhFDC1</i> que producen cambio de aminoácidos en la secuencia proteica deducida del mismo.	156
Tabla 11. Amplificación o no de la banda de 130 pb con los cebadores FDC1_Dh_Full_Rv y FDC1_Dh_Pentadien en una selección de cepas de <i>D. hansenii</i> .	167

Capítulo 3 **Utilización de tecnología MWIR para la detección de la capacidad deteriorante de levaduras por producción de 1,3-pentadieno y CO₂**

	Página
Tabla 1. Ejemplos de aplicaciones de narices electrónicas en alimentos y bebidas.	187
Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de espectrometría MIR en alimentos y bebidas.	192
Tabla 3. División de la radiación infrarroja media.	193
Tabla 4. Concentraciones aproximadas de los compuestos usados en el ensayo en fase líquida.	199
Tabla 5. Rango de absorción que presentaban las muestras de patrones en líquido y gas, así como del espacio de cabeza de cultivos de <i>D. fabryii</i> PR66.	209
Tabla 6. Coeficiente R ² del ajuste de la respuesta de primer orden del comportamiento dinámico de la difusión de los gases en el dispositivo experimental según los <i>scores</i> del PC2, PC3 y PC4.	212

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción general

	Página
Figura 1. Equilibrio pH dependiente de los ácidos débiles dentro y fuera de la célula microbiana.	31
Figura 2. Principales mecanismos de resistencia frente a ácido sórbico en microorganismos.	35
Figura 3. Posibles causas del origen de los malos sabores y olores que pueden ocurrir en toda la cadena de producción y suministro.	41
Figura 4. Esquema de la respiración y fermentación de azúcares que ocurre en levaduras.	42
Figura 5. Clasificación de los modelos predictivos así como tipos de modelos primarios, secundarios y terciarios.	46
Figura 6. Fases de la curva de crecimiento microbiano en un ambiente cerrado.	47
Figura 7. Representación gráfica del modelo linear trifásico de Buchanan et al., (1997).	50
Figura 8. Comparación del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> usando cuatro de los modelos primarios descritos.	53

Capítulo 1 Modelización del crecimiento superficial de levaduras sobre medios sólidos y su aplicación al efecto inhibidor del sorbato potásico

	Página
Figura 1. Tipos de alimentos en función de su estructura y ejemplos.	64
Figura 2. Secciones del modelo de crecimiento de las colonias de Pirt, (1967).	67
Figura 3. Esquematzación de las distintas fases del crecimiento de la colonia según Kamath y Bungay, (1988).	69
Figura 4. Ejemplos de la aplicación de medidas de DO en el estudio con colonias.	75
Figura 5. Procedimiento seguido para el análisis del crecimiento en medio líquido y sólido.	77
Figura 6. Comparación del crecimiento de células viables en YMB e YMA con ajuste por el modelo de Baranyi y Roberts, 1994 y crecimiento del área de colonias en YMA.	85
Figura 7. Comparación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo a lo largo del crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en YMB e YMA.	86
Figura 8. Crecimiento del Ln de UFC/colonia y la disminución de la tasa específica de crecimiento (μ) a lo largo del tiempo con distintos inóculos iniciales.	89-90
Figura 9. Pasos que realiza el algoritmo de análisis de imagen desarrollado para el estudio del crecimiento de colonias.	93

Figura 10. Aumento del radio colonial junto con el aumento del cuadrado del radio a lo largo del tiempo de los distintos inóculos iniciales, junto a los ajustes para la ecuación de Gompertz del radio, “ley de crecimiento lineal del radio” y “ley de crecimiento del área”.	98-99
Figura 11. Cinética de crecimiento a lo largo del tiempo del área de las colonias originadas por cuatro inóculos en las cuatro cepas estudiadas y el ajuste de la ecuación de Gompertz del área.	101
Figura 12. Validación de los modelos de Gompertz de crecimiento del radio y área con los datos de Gray y Kirwan, (1974).	103
Figura 13. Correlación entre el número de células totales en la colonia con el área de la misma a través del parámetro C_s .	105
Figura 14. Comparación del crecimiento del Ln de las UFC/colonia y del área a pH 7 y pH 5,6 sin y con 0,75 g/l de sorbato potásico y los ajustes de los correspondientes modelos.	108
Figura 15. Comparación del crecimiento del Ln de las UFC/colonia y del área a pH 5,6 sin y con 0,75 g/l de sorbato potásico y los ajustes de los correspondientes modelos.	110

Capítulo 2

Biología molecular de la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos por levaduras

	Página
Figura 1. Conversión del ácido sórbico en 1,3-pentadieno.	129
Figura 2. Estructura de los ácidos fenilacrílicos y sus correspondientes fenoles volátiles que se pueden generar.	131
Figura 3. Genes descritos en <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. niger</i> como necesarios para la descarboxilación de ácidos fenilacrílicos y su posición en los cromosomas.	132
Figura 4. Cromatograma de gases y Espectro de masas de la inyección del gas del espacio de cabeza de una suspensión en YMB de 1,3-pentadieno puro y del gas de cabeza del cultivo de <i>D. hansenii</i> CECT 11369 ^T en YMB con 0,75 g/L de sorbato potásico.	144
Figura 5. Parte del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen <i>DhPAD1</i> , pertenecientes a diferentes cepas de <i>D. hansenii</i> .	147
Figura 6. Parte del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los amplicones del gen <i>DhPAD1</i> de diferentes cepas de <i>D. hansenii</i> .	148
Figura 7. a) Mapa de restricción del gen <i>DhPAD1</i> de <i>D. hansenii</i> con la enzima <i>Rsa</i> I. b) Perfil de restricción del gen <i>DhPAD1</i> de cepas de <i>D. hansenii</i> con la enzima <i>Rsa</i> I. c) Perfiles de restricción del gen <i>DhPAD1</i> de una selección de cepas de <i>D. hansenii</i> con la enzima <i>Rsa</i> I.	149
Figura 8. a) Curvas de disociación de los productos amplificados por RT-PCR. b) Expresión relativa del gen <i>DhPAD1</i> de cepas de <i>D. hansenii</i> a 24 h en presencia de sorbato potásico en el medio con respecto a sin sorbato.	150

Figura 9. Parte del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen <i>ZrPAD1</i> , pertenecientes a diferentes cepas de <i>Z. rouxii</i> .	152
Figura 10. Alineamiento de las secuencias proteicas Pad presentes en diferentes especies.	153
Figura 11. Estructura terciaria de las proteínas UbiX de <i>P. aeruginosa</i> y UbiX/Pad1 de <i>E. coli</i> .	154
Figura 12. Parte del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen <i>DhFDC1</i> , pertenecientes a diferentes cepas de <i>D. hansenii</i> .	157- 158- 159
Figura 13. Parte del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los amplicones del gen <i>DhFDC1</i> de diferentes cepas de <i>D. hansenii</i> .	160
Figura 14. Secuencia de nucleótidos del gen <i>DhFDC1</i> y aminoácidos de su correspondiente proteína, así como las deleciones y los codones STOP que generan.	161
Figura 15. Parte del alineamiento de la regiones de las secuencias nucleotídicas del gen <i>ZrFDC1</i> pertenecientes a cepas de <i>Z. rouxii</i> .	162
Figura 16. Parte del lineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los amplicones del gen <i>ZrFDC1</i> de diferentes cepas de <i>Z. rouxii</i> .	162
Figura 17. Alineamiento de las secuencias proteicas Fdc presentes en diferentes especies.	164- 165
Figura 18. Estructura terciaria de las proteínas Fdc de <i>S. cerevisiae</i> .	165
Figura 19. Amplificación en cepas de <i>D. hansenii</i> con los cebadores FDC_Dh_Pentadien/FDC1_Dh_Full_Rv.	167
Figura 20. Esquema del funcionamiento del sistema de descarboxilación formado por las enzimas Pad1 y Fdc1.	173

Capítulo 3 Utilización de tecnología MWIR para la detección de la capacidad deteriorante de levaduras por producción de 1,3-pentadieno y CO₂

	Página
Figura 1. Esquema de las partes de un cromatógrafo de gases.	182
Figura 2. Representación esquemática de los componentes de una nariz electrónica.	185
Figura 3. Espectro de la radiación electromagnética y tipos de radiación infrarroja.	188
Figura 4. Representación esquemática de los componentes de un detector de gases infrarrojo, con una o dos cámaras.	189
Figura 5. Diferentes formatos de detectores MWIR.	194
Figura 6. Dispositivo diseñado para la media de gases con detectores de MWIR.	197
Figura 7. Cápsula con dos aberturas diseñada para confinar el gas en su interior.	198
Figura 8. Sistema de un par de obleas de zafiro en paralelo entre la lámpara y el detector, entre las cuales se depositan las muestras líquidas.	199

Figura 9. Tubo de medición con tapón hermético que incluye una llave de apertura y cierre para la salida de los gases.	200
Figura 10. Esquema sumario de los procedimientos seguidos para el análisis de los espectros generados.	201
Figura 11. Método empleado para calcular el ancho de las bandas de absorción de los espectros.	203
Figura 12. Espectro MWIR de concentraciones de sorbato potásico y 1,3-pentadieno en fase líquida.	207
Figura 13. Primera derivada del espectro correspondiente a 1,3-pentadieno y sorbato potásico.	208
Figura 14. Espectro MWIR del espacio de cabeza de cultivos de la cepa <i>D. fabryi</i> PR66 con sorbato potásico tomado a los 30 segundos de la apertura de la cápsula.	209
Figura 15. Ejemplo de la dinámica de adquisición de espectros desde la apertura al cierre de la llave de entrada de los gases del espacio de cabeza de un cultivo de la cepa <i>D. fabryi</i> PR66 dentro de la cápsula.	210
Figura 16. <i>Loadings</i> o contribución de cada una de las longitudes de onda en el componente principal 2, 3 y 4 y compuestos sobre los que pueden dar información.	211
Figura 17. Representación de los <i>scores</i> o coordenadas que cada espectro individual de las muestras toma en el espacio definido por cada uno de los componentes principales.	213
Figura 18. Valores de nivel máximo de intensidad, a , de la respuesta de primer orden del comportamiento dinámico de la difusión de los gases en el dispositivo experimental según los <i>scores</i> del PC2, PC3 y PC4.	214
Figura 19. Análisis de clúster jerárquico de los valores de intensidad máxima de señal, a , de los espectros dinámicos del PC2, PC3 y PC4.	215
Figura 20. Análisis discriminante de la media de los 2000 últimos espectros de las muestras y posterior proyección de los espectros individuales sobre el plano canónico definido por las medias.	217
Figura 21. Coeficientes con los que contribuyen las longitudes de onda en las variables canónicas para la clasificación de los espectros.	217
Figura 22. Poder de segregación de los espectros en función del área de los centroides provenientes de la proyección de los espectros medios de diferentes tiempos de la grabación dinámica en las variables canónicas definidas por análisis discriminante.	218

RESUMEN

INTERACCIÓN SORBATOS-LEVADURAS EN ALIMENTOS: MODELIZACIÓN DE SU EFECTO EN MEDIO SÓLIDO, BIOLOGÍA MOLECULAR Y DETECCIÓN DE SU TRANSFORMACIÓN EN 1,3-PENTADIENO POR MWIR

El ácido sórbico y sus sales son conservantes ácidos débiles cuya actividad fungistática reside en las formas sin disociar favorecidas a pHs ácidos. Algunos microorganismos pueden convertirlos en compuestos generalmente malolientes sin actividad antimicrobiana, como el 1,3-pentadieno. La base molecular de su producción, atribuida a la proteína Pad, se ha estudiado mayoritariamente en hongos y en la levadura *S. cerevisiae*. La mayoría de los alimentos donde se ha descrito la producción de 1,3-pentadieno ha sido en alimentos sólidos, en los cuales el crecimiento microbiano es muy diferente respecto al crecimiento en alimentos líquidos, lo que hace que no sea fiable extrapolar directamente los datos de uno a otro. Ante problemas de deterioro por este compuesto, las industrias recurren a técnicas caras de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para su detección. Por todo ello, los objetivos generales de esta Tesis son:

1. Modelización del crecimiento superficial de levaduras sobre medios sólidos y su aplicación al efecto inhibitor del sorbato potásico
2. Análisis molecular de la producción de 1,3-pentadieno en las levaduras *D. hansenii* y *Z. rouxii*.
3. Utilización de un detector basado en espectroscopía de infrarrojo medio (MWIR) para detectar gases responsables del deterioro por levaduras de alimentos.

La metodología, resultados y conclusiones correspondientes son las siguientes:

1. Para analizar el crecimiento superficial colonial de levaduras se han utilizado metodologías clásicas del recuento celular, modelos primarios como el de Gompertz y se ha diseñado un algoritmo de análisis de imagen.

Hemos observado que la cinética de crecimiento de células viables en medio sólido (YMA) es diferente de la de medio líquido (YMB). Tras una fase de crecimiento exponencial con tasas específicas de crecimiento (μ) constantes y máximas en ambos, en sólido aparece un crecimiento restrictivo con disminución exponencial de μ con el tiempo hasta alcanzar una fase pseudoestacionaria donde todavía hay incremento en tamaño de las colonias. Proponemos una combinación del modelo exponencial inicial seguido de una adaptación del modelo de Gompertz para describir el crecimiento de células viables en la colonia.

Se han desarrollado rutinas de análisis de imagen que han permitido obtener de forma rápida, precisa y con poco error parámetros de las colonias sin considerar una circularidad exacta. Para describir todo el crecimiento superficial de colonias proponemos utilizar una misma ecuación de Gompertz en términos de radio o área y, además, la utilización del área como parámetro indirecto del número de total de células gracias al parámetro C_5 . Este modelo de crecimiento de colonias se aplica a datos de varias especies de levaduras de taxones y metabolismo energético muy diferentes y supone una herramienta para evaluar cuantitativamente cambios en las condiciones de crecimiento.

La aplicación de las herramientas y el modelo desarrollado al efecto inhibitor del sorbato sobre el crecimiento de levaduras en superficies sólidas nos ha permitido establecer que su efecto tóxico también depende de las formas sin disociar favorecidas a pHs más ácidos y a su vez, nos ha permitido cuantificar sus efectos, similares al descrito en medio líquido: disminución de μ durante el crecimiento exponencial, aunque más prolongado, acompañado de disminución de biomasa final, tanto en área como número de células. El efecto sobre la μ inicial tiene diferente intensidad siendo en *S. cerevisiae* mayor que en *D. hansenii*. Pero la sensibilidad/tolerancia de una cepa en medio sólido no puede medirse únicamente por este efecto inicial porque hemos detectado que algunas cepas de *D. hansenii* y *Z. rouxii* pueden adaptarse y alcanzar lentamente los mismos valores de biomasa final que en ausencia del conservante.

2. Para la detección de 1,3-pentadieno producido por levaduras hemos comparado una adaptación de una prueba rápida sensorial y resultados de cromatografía (GC-MS). Para estudiar la base molecular del proceso de descarboxilación entre los sorbatos y 1,3-pentadieno empleamos técnicas de PCR, secuenciación y alineamiento de secuencias nucleotídicas y proteicas. Hemos observado que la prueba sensorial a pH 7 y 0,75 g/l de sorbato potásico es un método rápido para detectar 1,3-pentadieno y, en esas condiciones las cepas de *Debaryomyces* descarboxilan hasta un 45 % de los mismos y *S. cerevisiae* y *Z. rouxii* menos de un 2 %. Hemos encontrado que en *D. hansenii* y *Z. rouxii* existen secuencias nucleotídicas con un 69 y 66 % de identidad respectivamente con el gen *PAD1* que codificaba la descarboxilasa responsable descrita en *S. cerevisiae*. El polimorfismo encontrado en cepas de *D. hansenii* no afecta a ningún residuo importante para la funcionalidad de la proteína, apoyando los estudios recientes que rechazan la función descarboxilasa de esta proteína y la atribuyen a la proteína Fdc1. También detectamos que en ambas levaduras existen secuencias con un 69 y 65 % de identidad respectivamente con la secuencia *FDC1* de *S. cerevisiae*. A diferencia de lo publicado en *S. cerevisiae* donde la incapacidad de

descarboxilación del sistema Pad/Fdc se debe a mutaciones sin sentido o inserciones en la región *FDC1* sumado o no a mutaciones sin sentido en el gen *PAD1*, comprobamos que en *D. hansenii* la incapacidad de producir 1,3-pentadieno se debe a deleciones comunes de un único nucleótido que generan un codón STOP que impide sintetizar el dominio 2 del monómero de la proteína Fdc1. Los polimorfismos comunes del gen *FDC1* en *D. hansenii* han permitido diseñar un protocolo de PCR para detectar cepas peligrosas productoras de 1,3-pentadieno. En *Z. rouxii* no hemos encontrado mutaciones significativas en los genes *PAD1* y *FDC1* que expliquen la incapacidad de algunas cepas de generarlo, sugiriendo que su producción dependa más de otros factores ambientales que regulen la actividad de estas enzimas o que necesite un mecanismo distinto.

3. Para detectar precozmente la producción de 1,3-pentadieno mediante tecnología barata, se ha empleado un detector MWIR dentro del rango entre 3 y 4,6 μm con un dispositivo para confinar gases. Se han grabado espectros dinámicos del espacio de cabeza de cultivos de levaduras y tras un suavizado y primera derivada se les aplicó un análisis quimiométrico/multivariante. Por técnicas no supervisadas, mediante el PCA de los espectros, observamos que el PC3 aportaba mucha información respecto a las longitudes de onda de absorción de los enlaces del 1,3-pentadieno entre 3,1-3,4 μm y, sin ser un objetivo, el PC2 respecto a las del CO_2 producido durante el crecimiento, entre 4,1-4,3 μm . Los *scores* que tomaban los espectros en los espacios definidos por el PC2, PC3 y PC4 se ajustaron mediante un ajuste no lineal de primer orden y con los valores del parámetro *a* del mismo (nivel máximo de intensidad) para los tres PCs se realizó un análisis de clúster que diferenciaba cultivos de levaduras muy productoras de CO_2 así como los que habían producido 1,3-pentadieno. El análisis supervisado mediante análisis discriminante de la media de los últimos espectros consiguió clasificar el 100 % de las muestras en función de la presencia o no de 1,3-pentadieno, empleando dos variables canónicas. Tras validaciones del procedimiento, el dispositivo MWIR podría ser utilizado como una alternativa barata, no destructiva, automatizable y sin necesidad de especialistas para detectar muestras afectadas por este tipo de deterioro y producción de CO_2 durante la línea de producción y/o distribución de los alimentos.

SUMMARY

**SORBATES-YEASTS INTERACTION IN FOODS: MODELING ITS EFFECT IN SOLID MEDIA,
MOLECULAR BIOLOGY AND DETECTION BY MWIR OF ITS TRANSFORMATION
INTO 1,3-PENTADIENE**

Sorbic acid and its salts are weak acidic preservatives whose fungistatic activity are caused by its undissociated forms favored at acid pHs. Some microorganisms can convert these acids generally into bad odor compounds without antimicrobial activity, such as 1,3-pentadiene. The molecular basis of its production has been studied mainly in fungi and the yeast *S. cerevisiae*, attributed to Pad1 protein. Most foods in which 1,3-pentadiene production has been described are solid, where microbial growth is very different from liquid ones and it is not accurate extrapolate data from one to another. Industries with this kind of spoilage problems use expensive techniques of gas chromatography coupled to mass spectrometry for their detection. Therefore, the general objectives of this Thesis are:

1. Modelling of yeast surface growth on solid media and its application to the inhibitory effect of potassium sorbate.
2. Molecular analysis of 1,3-pentadiene production by *D. hansenii* and *Z. rouxii* yeasts.
3. Use of a detector based on Mid-Wave InfraRed spectroscopy (MWIR) to detect gases responsible of food spoilage by yeast.

Methodology, results and its subsequent conclusions are the following:

1. In order to analyze colonial surface growth of yeast, classical cell counting methodologies and primary models such as Gompertz have been used, as well as an image analysis algorithm has been designed.

We observed that kinetics of viable cell growing in solid medium (YMA) is different from that of liquid medium (YMB). After an exponential growth phase in both with a constant and maximum specific growth rates (μ), in the solid one a restrictive growth appears. This growth has an exponential decrease of μ with time until reaching a pseudo-stationary phase, where there is still an increase in size of colonies. We propose a combination of the initial exponential model followed by an adaptation of Gompertz model to describe the growth of viable cells in the colony.

Image analysis routines have been developed, quickly enabling, accurately and with little error, to obtain colony parameters, without considering an exact circularity. To describe all surface growth of colonies we propose to use the same Gompertz equation for its radius or area and, in addition, using the area as an indirect parameter of the total cell number by C_s parameter. This model of colony growth can be applied to data from several yeast species of different taxons and with different energy metabolism, resulting in a good tool to evaluate quantitatively changes in growth conditions.

The application of the tools and the developed model to the inhibitory effect of the sorbate on the yeast's growth in solid surfaces has allowed us to establish that their toxic effect also depends on the non-dissociated forms favored at acid pHs. It has also allowed us to quantify their effects, similar to those described in liquid medium: decrease of μ during exponential growth, although for a longer period, accompanied by a decrease of the final biomass, in area and number of cells. The effect on the initial μ has different intensity, being greater in *S. cerevisiae* than in *D. hansenii*. But the sensitivity/tolerance of a strain in solid medium cannot be measured solely by this initial effect because we detected some strains of *D. hansenii* and *Z. rouxii* that can adapt and reach slowly the same values of final biomass as without preservative.

2. For 1,3-pentadiene detection produced by yeast we compared an adaptation of a rapid sensory test and chromatography results (GC-MS). To study the molecular basis of decarboxylation process between sorbates and 1,3-pentadiene we used PCR techniques, sequencing and alignment of nucleotide and protein sequences. We observed that sensory test at pH 7 and 0,75 g/l of potassium sorbate is a rapid method to detect 1,3-pentadiene and, at these conditions, *Debaryomyces* strains decarboxylate up to 45 % of them and less than 2 % *S. cerevisiae* and *Z. rouxii*. We found that *D. hansenii* and *Z. rouxii* have nucleotidic sequences with 69 and 66 % identity respectively to the *PAD1* gene encoding the responsible decarboxylase described in *S. cerevisiae*. Polymorphism found in strains of *D. hansenii* does not affect to important residues to protein functionality, supporting recent studies that reject the decarboxylase function of this protein and attribute it to the Fdc1 one. We also detected that both yeasts have sequences with a 69 and 65% identity with *FDC1* sequence of *S. cerevisiae*. In contrast to that published in *S. cerevisiae* where inability of decarboxylation of Pad/Fdc system is due to nonsense mutations or insertions in *FDC1* region added or not to nonsense mutations in *PAD1* gene, we found that the inability to produce 1,3-pentadiene of *D. hansenii* is due to common deletions of a single nucleotide that generate a STOP codon and prevents synthesizing the second domain of the Fdc1 monomer. The common polymorphisms of *FDC1* gene in *D. hansenii* have allowed us to design a PCR protocol to detect dangerous strains producing 1,3-

pentadiene. In *Z. rouxii* we have not found significant mutations in their *PAD1* and *FDC1* genes that explain the inability of some strains to generate it, suggesting their production depends more on other environmental factors that regulate the activity of these enzymes or they may need a different mechanism.

3. For an early detection of 1,3-pentadiene production using cheap technology, a MWIR detector from 3 to 4,6 μm has been employed with a device for confining gases. Dynamic spectra of headspace of yeast cultures have been recorded and a chemometric/multivariate analysis was applied after a smoothing and first derivative of them. By non-supervised techniques, using the PCA of spectra, we observed that PC3 provided many information regarding absorption wavelengths of 1,3-pentadiene bonds between 3,1-3,4 μm and, without being an aim, PC2 respect to CO_2 produced during yeast growth, between 4,1-4,3 μm . The scores that spectra took in the spaces defined by PC2, PC3 and PC4 were adjusted by a first order nonlinear adjustment. The cluster analysis of values of parameter α of it (maximum intensity level) for the three PCs differentiated cultures of yeasts producing high amounts of CO_2 as well as those that had produced 1,3-pentadiene. Supervised analysis by discriminant analysis of the mean of last spectra was able to classify 100 % of the samples according to the presence or not of 1,3-pentadiene, using two canonical variables. After a procedure validation, MWIR device could be used as an inexpensive, non-destructive, automated and not requiring specialist alternative to detect samples affected by this type of spoilage and CO_2 production during the food production and/or distribution line.

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS



La Tesis aquí desarrollada pertenece a la primera generación de becas ofertadas por el Programa Internacional de Captación de Talento (PICATA) del Campus de Excelencia Internacional Moncloa (CEI). Esta institución surgió como un acuerdo de colaboración entre las Universidades Complutense y Politécnica de Madrid y otros organismos presentes en el Campus de la Ciudad Universitaria para definir un espacio de conectividad entre las instituciones y sus grupos de investigación y, marcar así, un referente internacional en investigación, formación e innovación. Las becas PICATA, de las que fuimos uno de los grupos beneficiarios, se ofertaron con varios requisitos: en primer lugar, un abordaje multidisciplinar por medio de una codirección entre miembros de grupos pertenecientes a dos de las instituciones agregadas al CEI y, en segundo lugar, estar encuadradas dentro de uno de los cinco clústers temáticos en los que se divide el Campus.

La temática de esta Tesis se encuadra dentro del clúster de Agroalimentación y Salud como un abordaje multidisciplinar, tal y como se deriva de la pluralidad de los directores de tesis, y de la metodología utilizada. Los directores de la UCM: José Martínez Peinado y María Isabel de Silóniz Jiménez pertenecen al subgrupo de levaduras (YEAST) del grupo Hongos y Levaduras de Interés en Agroalimentación del departamento de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid. Dentro de este grupo, entre otros, tradicionalmente se realizan estudios relativos a la inhibición de levaduras mediante el empleo de conservantes ácidos débiles como ácido benzoico o ácido sórbico, así como el análisis de los efectos indeseables en los alimentos causados por la descarboxilación de éste último en 1,3-pentadieno (Casas et al., 1996, 1999, 2004; Quintas et al., 2005). Un aspecto relevante es que la mayoría de los estudios previos sobre conservantes se han realizado en medios líquidos y la mayoría de las cepas capaces de producirlo se aislaron de alimentos sólidos. Por ello en esta Tesis se consideró la hipótesis de estudiar el efecto que ejercía la estructura del alimento en la capacidad inhibitoria de los sorbatos y sus consecuencias. Además, se decidió iniciar los estudios para la creación o adaptación de un dispositivo de fácil implantación en la industria alimentaria para la detección de 1,3-pentadieno.

Para avanzar en estas dos líneas de investigación surgió la codirección con la Prof. Pilar Barreiro Elorza del grupo de investigación al que pertenece LPF-TAGRALIA: Técnicas Avanzadas en Agroalimentación, del departamento de Ingeniería Rural de la Universidad Politécnica de Madrid. Este grupo posee la experiencia en diferentes técnicas afines a la investigación propuesta: desarrollo de sensores inteligentes y narices electrónicas para compuestos volátiles ambientales (Correa Hernando et al., 2002, 2004; Ruiz-Altisent et al., 2010), aplicación de técnicas no destructivas para la medida de calidad en productos agroalimentarios como técnicas espectroscópicas o multiespectrales (Valero et al., 2005; Diezma-Iglesias et al., 2008; Barreiro et al., 2008; Lleó et al., 2009) y procesado y análisis de información por técnicas de análisis multidimensional y modelización analítica en todos sus estudios (Riquelme et al., 2008). Esta colaboración nos ha permitido en primer lugar, desarrollar las herramientas cuantitativas y los modelos para describir y analizar el crecimiento microbiano en medio sólido y aplicarlo en el efecto de los sorbatos (Capítulo 1, dirigido por el Prof. José Martínez Peinado (UCM)) y, en segundo lugar, aplicar por primera vez tecnología MWIR para la detección de emisiones de gases de origen microbianos en cultivos (Capítulo 3, dirigido por la Prof. Pilar Barreiro Elorza (UPM); ambos reflejados en dos publicaciones comunes en las revistas *Letters in Applied Microbiology* (Rivas et al., 2014) y en *Food Analytical Methods* (Rivas et al., 2016). Del mismo modo, en el grupo de levaduras siempre se ha tenido un especial interés en el desarrollo técnicas moleculares para la detección o tipificación de levaduras o sus híbridos de interés industrial (Wrent et al., 2010, 2015a, 2015b, 2016). El segundo de los capítulos (dirigido por la Prof. María Isabel de Silóniz) se centró en el análisis de las bases moleculares implicadas de la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos por levaduras, la mejora de los métodos de detección rápida y el desarrollo de un método molecular para la detección de cepas productoras, complementándose con una estancia en el grupo de la Prof. Isabel Sá-Correia del Instituto Superior Técnico de Lisboa. Este grupo acredita muchas publicaciones relacionadas con el análisis proteico y genético que conlleva a la resistencia de levaduras frente a otros ácidos débiles como ácido acético (Guerreiro et al., 2012; Mira et al., 2014).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la multidisciplinalidad de esta Tesis se ve reflejada en los objetivos de la misma, así como en los capítulos de esta memoria en los que se describen los experimentos, herramientas y análisis necesarios para alcanzarlos.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Levaduras como agentes deteriorantes de alimentos

A lo largo de la historia, las levaduras han tenido una estrecha relación con los seres humanos debido a sus capacidades fermentativas y su consecuente implicación en la elaboración de alimentos como el pan, miso, cacao y bebidas alcohólicas como la cerveza, el vino o la sidra. Esa buena relación comercial/económica está también presente cuando se utilizan en la maduración de otros alimentos fermentados, como ciertas carnes, quesos y leches. Así como por su uso como productores de ingredientes y aditivos o, incluso, como complemento alimenticio. Además, ciertas especies de levaduras se usan tradicionalmente en países asiáticos como agentes probióticos para tratar desórdenes intestinales (Fleet, 2006, 2011).

En contraste con las propiedades positivas de las levaduras en la producción alimenticia, unas pocas especies presentan aspectos negativos ya que están implicadas en el deterioro de alimentos y bebidas. De hecho, las mismas levaduras que contribuyen a la producción o madurado de algunos productos, pueden causar el deterioro en otros tipos de alimentos (Maráz y Kovács, 2014). De las 1500 especies de levaduras descritas, entre 100-150 han sido aisladas de alimentos o bebidas y sólo el 10 % de ellas (15-20 especies) están implicadas frecuentemente en procesos de deterioro (Fleet, 2011).

El deterioro de los alimentos y bebidas por levaduras es la consecuencia del crecimiento de las mismas en el producto, bien por producción de biomasa o bien por los metabolitos que generan (Maráz y Kovács, 2014). Esto origina una serie de síntomas de deterioro, al verse alteradas algunas de las propiedades químicas, físicas y/o sensoriales de los alimentos; síntomas perceptibles por el consumidor, que serían los responsables de la insatisfacción, queja o rechazo del producto (Stratford, 2006). En la mayoría de los casos, este deterioro únicamente implica una pérdida de calidad del mismo aunque no conlleva una pérdida nutricional ni de seguridad.

1.1 Levaduras alterantes

Recientemente Fleet (2011) ha publicado una lista de las 15-20 especies de levaduras frecuentemente implicadas en procesos de deterioros de los alimentos o bebidas. En función de su mayor o menor incidencia como agentes deteriorantes, las levaduras se clasifican en varios grupos (Tabla 1) (Davenport, 1996, 1997, 1998), aunque la respuesta deteriorante puede variar entre cepas (Fleet, 2011). El grupo 1 contiene, entre otras, a *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera bruxelensis* y ciertas cepas de *S. cerevisiae*, consideradas como las levaduras más peligrosas por alguna de sus propiedades

Tabla 1. Especies de levaduras así como sus propiedades fisiológicas y los síntomas que desencadenan en los alimentos y bebidas que deterioran frecuentemente (Modificación de Pitt y Hocking, 2009; Fleet, 2011 y Maráz y Kovács, 2014).

Espece de levadura	Propiedades fisiológicas importantes	Alimento que deteriora	Principales síntomas de deterioro
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Muy tolerante a la sal	Productos cárnicos salados, quesos, vegetales fermentados	Película en superficie, malos sabores y olores
<i>Dekkera/Brettanomyces D. anomala, D. bruxelensis</i>	Muy fermentativas, CO ₂ y etanol tolerante	Bebidas alcohólicas y refrescos	Producción de ácidos orgánicos, malos olores y sabores, película en superficie
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ácido tolerante	Frutas, vegetales, zumos, vinos	Formación de gas, malos sabores
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fermenta lactosa, pectinolítica, proteolítica, crece a 40-45°C	Productos lácteos, productos de plantas	Formación de gas, olor a levadura
<i>Pichia kudriavzevii</i> (antes <i>Issatchenkia orientalis</i>)	Ácido y etanol tolerante	Productos lácteos, vegetales fermentados	Formación de gas, película en superficie
<i>Pichia membranifaciens</i>	Oxidativa, ácido y etanol tolerante, resistente a conservantes	Frutas, zumos, vegetales fermentados, lácteos, carnes	Formación de gas, película en superficie, malos sabores
<i>Rhodotorula</i> spp. <i>R. glutinis, R. mucilaginosa</i>	Oxidativa, lipolítica, proteolítica, pectinolítica	Frutas, vegetales, productos lácteos, productos de panadería, carnes	Colonias rojas en superficie, reblandecimiento, película en superficie
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Muy fermentativa, etanol tolerante	Alimentos y bebidas como zumos o lácteos	Formación de gas, película en superficie, olor a levaduras
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Ácido acético y etanol tolerante, muy fermentativa	Zumos de frutas, bebidas	Formación de gas, película en superficie
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tolerante a altas concentraciones de azúcar y etanol, muy fermentativa, resistente a conservantes	Zumos, bebidas alcohólicas	Formación de gas, película en superficie, malos sabores y olores
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Oxidativa, proteolítica y lipolítica, tolerante a bajos pHs, y altas concentraciones de sal y conservantes	Carne y productos lácteos	Cambios de textura, malos sabores y olores
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (antes <i>Pichia anomala</i>)	Ácido y sal tolerante, etanol tolerante, productora de etilacetato	Productos lácteos, fruta, productos de panadería	Película en superficie, malos olores y sabores
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Ácidos y etanol tolerante, resistente a conservantes	Frutas, zumos, bebidas alcohólicas	Formación de gas
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Tolerante a altas concentraciones de azúcar, resistente a conservantes	Zumos, miel, mermeladas, frutos secos, productos de confitería	Formación de gas, malos olores y sabores

fisiológicas como: resistencia a conservantes (particularmente ácidos débiles), osmotolerancia o alta capacidad fermentativa. En el grupo 2 aparecen especies que causan deterioro en una menor escala, consideradas como oportunistas porque causarían problemas de deterioro cuando hay poca higiene en los procesos o se producen errores de manufacturación. En este grupo se encuentran *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus* y ciertas especies de *Pichia* entre otras. El tercer grupo incluiría a las levaduras que rara vez causan deterioro en los alimentos pero que son consideradas como indicadoras de higiene, como especies de *Rhodotorula*.

Las principales fuentes de contaminación por levaduras en la producción de los alimentos y bebidas suelen ser las materias primas, como las frutas y vegetales o el azúcar; también el agua, el suelo o el aire, la suciedad de los equipos de procesado y empaquetado y por último, los vectores como los insectos (Deák, 2008).

1.2 Características del alimento para el deterioro por levaduras

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza: en el suelo, el agua, el aire, en animales, especialmente insectos y, en plantas, fundamentalmente en frutas y verduras. Estos ambientes se consideran las principales fuente de infección de levaduras en la producción de alimentos y bebidas ya que, en la mayoría de ellos, éstas permanecen en un estado *resting* o de latencia debido a la disponibilidad limitada de nutrientes y a las condiciones climatológicas adversas; en contraste con el buen hábitat que les proporcionan los alimentos donde encuentran los azúcares, aminoácidos, minerales y vitaminas necesarios para su crecimiento (Stratford, 2006; Deák, 2008; Maráz y Kovács, 2014). Su supervivencia, colonización y crecimiento en los alimentos va a depender de un proceso competitivo con otros microorganismos presentes, como bacterias, cuya tasa de duplicación es mucho más rápida que las levaduras, con hongos y cultivos iniciadores; de forma que, este proceso competitivo se inclinará hacia el mejor crecimiento de las levaduras si existen mejores condiciones para ellas. Deák en 2008 estableció que el desarrollo de levaduras en alimentos va a depender de las propiedades de los mismos (factores intrínsecos), propiedades del ambiente (factores extrínsecos) y propiedades de los microorganismos (factores implícitos).

En cuanto a los factores intrínsecos que favorecen el crecimiento de levaduras destaca en primer lugar el que las levaduras sean más tolerantes a baja actividad de agua que las bacterias, creciendo la mayoría en rangos de 0,90-0,95. Las especies *D. hansenii* y *Z. rouxii* son dos de las especies comúnmente relacionadas con el deterioro de alimentos con alto contenido de sal o

de azúcar respectivamente, llegando a soportar hasta un 24 % (p/v) de sal la primera y un 70 % (p/v) de azúcar la segunda (Fleet, 2011). En segundo lugar, en cuanto al pH de los alimentos, las levaduras también son más resistentes que las bacterias a pHs ácidos. En general prefieren crecer en un ambiente ácido entre pHs de 4,5 y neutro llegando alguna de ellas a crecer a valores inferiores a 2 como *H. uvarum* o *Z. bailii* (Martorell et al., 2007) o superiores a 10 como especies del género *Rhodotorula* (Deák y Beuchat, 1996). En cuanto a los nutrientes de los alimentos, las levaduras son capaces de asimilar y fermentar gran cantidad de azúcares, utilizar diversas fuentes de compuestos nitrogenados así como de hidrolizar proteínas y degradar lípidos (Tabla 1) (Fleet, 1990).

Respecto a los factores extrínsecos de mayor influencia en el crecimiento de las levaduras en alimentos resaltan la temperatura y la disponibilidad de oxígeno durante el almacenamiento de los alimentos. La mayoría de las levaduras son mesófilas con temperaturas óptimas de crecimiento entre 20 y 30°C. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer a temperaturas superiores a 40°C como *Kluyveromyces marxianus* y otras son tolerantes a temperaturas de refrigeración (2-10°C) llegando algunas de ellas a crecer a menos de 0°C como *D. hansenii*, *Y. lipolytica* y ciertas especies de *Rhodotorula* o *Cryptococcus* (Guerzoni et al., 1993; Russell, 2009). En lo referente a la disponibilidad de oxígeno, las levaduras fermentativas tendrán una mayor ventaja sobre los microorganismos aerobios estrictos en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno, como en los intersticios de los alimentos o en alimentos envasados en atmósferas modificadas (Stratford, 2006).

En cuanto a los factores implícitos, el deterioro por levaduras va a depender de las capacidades metabólicas propias de la especie y, en muchos casos, llegando al nivel de cepa. Las células en fase estacionaria son más resistentes a estrés que las células en fase exponencial (Zakrzewska et al., 2011), por lo que el estado fisiológico de las células contaminantes junto con los requerimientos nutricionales, el tipo de metabolismo y la posible resistencia a conservantes son las características implícitas que determinarán inicialmente si la cepa de levadura puede avanzar en el proceso de deterioro de un alimento o bebida.

1.3 Importancia del deterioro por levaduras

La legislación española y comunitaria recoge en diferentes reglamentos los criterios microbiológicos de cada alimento, centrados mayoritariamente en la ausencia o presencia dentro de ciertos límites, de determinados microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, aerobios mesófilos y microorganismos indicadores de contaminación fecal como *Escherichia coli*, *Enterobacterias*

coliformes o *Clostridium*. La legislación también hace referencia a los niveles máximos de mohos y levaduras permitidos, pero únicamente en ciertos productos como se muestra en la Tabla 2 y sin especificar grupos o especies de los mismos. La escasa legislación referente al número de levaduras en alimentos se debe a la prácticamente nula implicación de las levaduras contaminantes de alimentos en problemas de salud pública y a que las principales levaduras patógenas como *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans* no se transmiten a través de la ingesta de alimentos o bebidas (Fleet, 1990). Sin embargo, cada vez hay más estudios que demuestran que la ingesta de alimentos con altos niveles de levaduras, especialmente en personas inmunodeprimidas o con largos tratamientos de antibiótico, puede dar lugar a la aparición de alergias y trastornos de hipersensibilidad como migrañas, problemas respiratorios, asma y gastroenteritis, además de los problemas que conlleva la ingesta de las aminos biógenas que producen (Loureiro y Querol, 1999; Eaton, 2002; Fleet y Balia, 2006; Álvarez y Moreno-Arribas, 2014). Estos problemas podrían ser el resultado de las reacciones derivadas con ciertos componentes celulares, metabolitos, proteínas o polisacáridos de la pared celular (Howell, 2016).

Tabla 2. Síntesis de los límites máximos permitidos de mohos y levaduras en alimentos recogidos en la legislación española y comunitaria. Recopilación de Moragas y Pablo, 2015.

Tipo de alimento	Mohos/Levaduras (UFC/g o ml)	Normativa
Caramelos duros	10	R.D. 1810/91, derogado por R.D. 135/2010
Otros caramelos, chicles, confites y golosinas	$3 \cdot 10^2$	
Cereales	$10 - 10^4$	R.D. 1094/87 derogados por R.D. 135/2010
Cuajo y enzimas coagulantes de la leche	10	O. 14/1/88 derogado por R.D. 135/2010, O. 20/2/96
Preparados dietéticos o de lactantes	10^3	R.D. 2685/76 y R.D. 867/2008 derogados por el R.D. 135/2010
Pastelería, bollería confitería y repostería	$5 \cdot 10^2$	R.D. 1124/82 derogado por R.D. 135/2010 R.D. 2419/1978 derogado por R.D.135/2010
Grasas y preparados grasos	10^2	R.D. 1011/81 derogado por R.D. 135/2010
Mantequilla	10^2	O. 7/01/1975 derogada por R.D. 200/2009
Turrone	10 (Lipolíticos) 10^3	R.D. 1167/90 derogado por R.D. 135/2010

R. D. Real Decreto
O. Orden Ministerial

Normalmente las industrias tienen implantado un sistema de buenas prácticas de fabricación, (GMP, *Good Manufacturing Practices*) que incluyen un análisis de peligros y puntos críticos, (APPC o HACCP *Hazard Analysis Critical Control Point*) así como buenas prácticas higiénicas para prevenir y minimizar problemas de contaminación en cualquier punto de la cadena de producción (Fleet, 2011). A pesar de todos estos sistemas, las industrias alimentarias cuando

tienen incidentes por deterioro mantienen la confidencialidad por miedo a las consecuencias, directamente ligadas a este tipo de incidentes. Entre estas consecuencias están los costes directos por pérdidas económicas, que incluyen la retirada del producto, la limpieza de la planta de fabricación y la investigación del foco, y por otro lado los costes indirectos, que implican el daño a la imagen y a la reputación de la compañía y la marca provocando que a la larga sus ventas disminuyan (Stratford, 2006; Fleet, 2011). La confidencialidad al respecto, hace que las magnitudes reales del deterioro de alimentos por levaduras deban ser en realidad mucho mayores que las descritas en algunas publicaciones.

1.4 Tipos de deterioro

Tras la contaminación inicial de las levaduras contaminantes en los alimentos, que normalmente se da en inóculos bajos (Francois et al., 2003), éstas comenzarían a crecer y alrededor de los 10^4 - 10^5 células o UFC por gramo o mililitro del producto, empiezan a aparecer los primeros signos del deterioro, que se hacen muy evidentes cuando se alcanzan los 10^7 - 10^8 células/ml o g (Fleet, 2011). Dependiendo de las características del alimento, en ellos se podrá originar un tipo de deterioro u otro, del mismo modo que una misma especie de levadura, en función del alimento en el que se encuentre, puede originar diferentes tipos de deterioro. En la Tabla 3 aparecen los principales deterioros que se dan en cada tipo de alimento.

Tabla 3. Principales tipos de deterioro ocasionados por levaduras en diferentes alimentos. (Modificación de Loureiro y Querol, 1999).

Producto	Efecto de deterioro							
	Crecimiento en superficie	Decoloración o coloración	Producción de gas	Turbidez	Sedimentos	Película	Malos olores y sabores	Cambios de textura
Verduras	Frescas	*	*				*	*
	Encurtidos	*	*	*		*	*	*
	Listas para comer	*		*			*	
Frutas	Frescas		*	*			*	*
	Zumos		*	*	*	*	*	
	Preparados	*		*			*	
Bebidas	Vino, cerveza		*	*	*	*	*	
	Refrescos		*	*	*		*	
Dulces	Repostería, mermeladas, jaleas	*	*	*	*	*	*	*
	Jarabes, miel, fruta conc.			*	*	*	*	
Derivados lácteos	Mantequilla, nata		*				*	
	Quesos		*	*			*	
	Yogures			*		*	*	
Pan de molde, masa de pan sin hornear	*	*					*	
Mayonesa, aliños		*	*			*	*	*
Carne, productos cárnicos	*	*	*				*	

El deterioro más común por levaduras es la producción de gas debido principalmente a la fermentación de azúcares. La mayoría de las levaduras se consideran fermentativas facultativas porque pueden cambiar su metabolismo de respiración aerobia a fermentación, dependiendo

de si el alimento o el medio contiene una alta concentración de glucosa (“Efecto Crabtree”) o si no hay mucho oxígeno disponible (Efecto Pasteur) (Deák y Beuchat, 1996). Esta versatilidad metabólica junto con el gran rango de azúcares fermentables por las levaduras hacen que la producción de gas llegue en algunos casos a deformar o incluso romper los envases (Stratford, 2006), problema que detallará en la sección 3.2.

Otros tipos de deterioro visible es la formación de biomasa, que se observa como colonias o biopelículas en la superficie de los alimentos. Debido a la propia estructura de los alimentos sólidos o gelificados, los microorganismos están obligados a crecer sobre su superficie o en sus intersticios formando colonias (Wilson et al., 2002). Es frecuente encontrarse en alimentos sólidos colonias blancas, color crema o rojas pertenecientes a especies de los géneros *Sporobolomyces* o *Rhodotorula*, pero en algunos casos dichas colonias al tener un color parecido al del propio alimento pasan desapercibidas. Cubriendo y flotando sobre la superficie de alimentos líquidos es característica la formación de películas debido a especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Pichia* y *Dekkera/Brettanomyces*. En el resto de alimentos líquidos, las levaduras pueden sedimentar formando una gruesa capa de células, formar colonias en el fondo del producto, o dispersarse en el líquido provocando su turbidez (Stratford, 2006; Maráz y Kovács, 2014).

Todos los signos visibles de deterioro por levaduras comentados, normalmente están acompañados por el desarrollo de sabores y olores desagradables en los productos, bien por la eliminación de ciertos componentes del alimento, bien por el propio sabor de las levaduras, como ocurre con *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, o por la producción de pequeñas moléculas organolépticas, en algunos casos volátiles, que son generadas en su metabolismo. De entre los malos sabores y olores que se pueden generar, la producción de etanol es el que se da con mayor frecuencia debido a que se genera en cantidades equimoleculares con el CO₂ en levaduras fermentativas y desencadena un sabor a “mala cerveza o mal vino”. En la sección 3.1 se detallarán más ejemplos.

1.5 Mecanismos para prevenir el deterioro

Las industrias alimentarias además de sistemas de “GMP” y “APPC”, deben seguir unas buenas prácticas higiénicas en toda la producción, envasado y almacenamiento del producto y desarrollar una efectiva limpieza y saneamiento de toda la línea. Además de estas medidas preventivas, existen sistemas para prevenir el deterioro de los alimentos por microorganismos como la propia composición del alimento, tratamientos físicos o químicos. En la mayoría de los casos se usa una combinación de varios mecanismos porque uno solo puede ser insuficiente

(Torres et al., 2016). La propia composición del alimento juega inicialmente un papel importante para prevenir el deterioro por levaduras. Por ejemplo, las especies *Z. bailii*, *D. bruxellensis* y *S. ludwigii* requieren vitaminas del grupo B para su crecimiento, haciendo que su presencia esté restringida a alimentos que las contengan, como zumos y frutas (Stratford, 2006; Wareing y Davenport, 2008). Se ha demostrado que los aceites vegetales provenientes de ajo y cebolla tienen una fuerte actividad contra *Z. rouxii* (Kim et al., 2004), al igual que el aceite de canela, de menta y los cítricos frente a un gran número levaduras (Tserennadmid et al., 2011; Tyagi et al., 2013).

En cuanto a los tratamientos físicos destacan los tratamientos térmicos, la deshidratación, irradiación, la presión y campos eléctricos pulsados, aunque también se usa una combinación de varios de estos tratamientos de forma más suave. Los más utilizados y efectivos son los tratamientos térmicos, que se pueden aplicar a algunos alimentos en sí, a sus materias primas, a los envases, o a los tres. Por lo general, la mayoría de las levaduras mueren rápidamente a temperaturas entre 55 y 65°C, aunque hay ciertas especies termorresistentes (Stratford, 2006; Deák, 2008) y las ascosporas suelen ser más resistentes que sus células vegetativas (Davenport, 1980). Dentro de los tratamientos térmicos también se incluye la conservación de los alimentos en refrigeración o congelación (Torres et al., 2016). La deshidratación o disminución de la actividad de agua de los alimentos por alta concentración de sal o azúcar es uno de los métodos de conservación más antiguos. El procesamiento de los alimentos a alta presión o el uso de campos eléctricos pulsados es una prometedora alternativa a la conservación por calor para mantener una alta calidad nutricional sin producir cambios organolépticos (Deák, 2008; Raso et al., 2014; Milani et al., 2015).

Para la conservación de los alimentos existen una gran cantidad de compuestos químicos que se añaden a su composición y cuya principal función es retrasar el crecimiento o matar los microorganismos patógenos y deteriorantes presentes en él. El Reglamento (CE) N° 1129/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo regula en la Unión Europea la dosis máxima y el tipo de conservante, tanto orgánico como inorgánico, que se añade en cada alimento (Comisión Europea, 2011; Mani-López, et al., 2016).

La carbonatación es un tratamiento químico ampliamente utilizado en bebidas (código E-290 en la reglamentación europea) y el uso del CO₂ en *quantum satis* para el envasado en atmósferas modificadas. Éste provoca una modificación de la membrana y una disminución del pH intracelular de las levaduras (García-González et al., 2007; Deák, 2008). El dióxido de azufre (E-220) se usa de manera tradicional en la conservación de vino, sidra y cerveza, aunque su uso

actual se ha extendido a otros alimentos y también se emplean sulfitos y bisulfitos (E-221-228). Su dosis varía entre 50 y 2000 mg/Kg o mg/l según el alimento. El SO₂ es la única forma que puede penetrar en el interior celular donde se disocia en sus iones y genera una disminución del pH citoplásmico. *Z. bailii*, *S. cerevisiae* o *S. ludwigii* son tres de las especies más resistentes a este tratamiento (Stratford, 2006).

El ácido acético (E-260 y sus sales E261-263) aunque la legislación lo reconoce como un acidulante, es considerado un ácido débil y se puede usar en *quantum satis* en ciertos alimentos aprovechándose también su acción antimicrobiana, como en quesos, frutas, hortalizas o conservas. Su acción antimicrobiana, al ser un ácido débil es pH dependiente. Una de las especies más resistentes a ácido acético es *Z. bailii* (Guerreiro et al., 2012).

Los ácidos débiles constituyen un gran grupo donde se encuentran los conservantes más usados en alimentos, como son el ácido benzoico, el ácido sórbico, el ácido propiónico y sus respectivas sales, las cuales, debido a su mejor solubilidad, son más utilizadas que los propios ácidos (Mani-López et al., 2016). Los ácidos débiles no suelen tener un efecto letal en los microorganismos, normalmente inhiben o retrasan su crecimiento (Stopforth et al., 2005). Del mismo modo que el ácido acético, la actividad de otros ácidos débiles es pH dependiente y su forma no disociada, mayoritaria a pHs ácidos, es la que tiene la actividad microbiana porque puede difundir al interior celular. El descenso del pH que origina en el citoplasma es el mecanismo de acción más aceptado de los ácidos débiles (Neal et al., 1965).

El ácido propiónico (E-280 y sus sales E-281-E-283) es más efectivo frente a mohos que a levaduras o bacterias (Deák, 2008), por eso se suele utilizar en el tratamiento de superficies de quesos en cantidades *quantum satis*, para impregnar el material de envasado y en productos de panadería con una dosis máxima de 3000 mg/Kg. El ácido benzoico (E-210 y sus sales E-211-E-213), al revés que el propiónico, es más efectivo frente a levaduras y bacterias y menos frente a mohos. Se utiliza en alimentos y bebidas con un pH por debajo de 4, porque en ese rango es más efectivo, como en salsas, lácteos y conservas (Deák, 2008). Se emplea en cantidades que no superan los 2000 mg/Kg o mg/l a excepción del tratamiento de huevo líquido con 5000 mg/Kg ó mg/l de benzoatos permitidos y productos cárnicos secos, donde se puede administrar en *quantum satis*. Se suelen emplear también sales de ésteres de ácido p-hidroxibenzoico de metilo o etilo (E-214-E-219) porque su eficacia es independiente del pH. Las especies del género *Zygosaccharomyces*, en especial *Z. bailii*, son las especies más resistentes a ácidos benzoicos (Stratford, 2006). Estos ácidos débiles se suelen usar solos o en combinación con sorbatos para aumentar su eficacia y reducir su concentración.

2. El ácido sórbico y los sorbatos

El ácido sórbico, 2,4-Hexadienoico ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$), es un ácido graso monocarboxílico, formado por una cadena alifática (lineal) doblemente insaturada (trans, trans). Aunque los dobles enlaces le dan cierta reactividad a la molécula, su grupo carboxilo es su parte más reactiva ya que le permite formar sales y ésteres (Stopforth et al., 2005). Este conservante tiene una baja solubilidad en agua (0,15 g por 100 ml) pero alta en alcohol o aceite (3 veces mayor que en agua). Sus sales sódica, potásica y cálcica son más solubles en agua que la forma ácida, por lo que estas se usan con más frecuencia en alimentos (Sofos y Busta, 1993). Concretamente, el sorbato potásico, al ser la forma muy soluble en agua, fácil de fabricar y muy estable (Stopforth et al., 2005).

Actualmente se considera que los sorbatos son unos de los conservantes más seguros que existen y cuatro veces más efectivos que otros conservantes de uso tan habitual como el benzoato o propionato (Sofos y Busta, 1993). Se clasifican como GRAS (*Generally Considered As Safe*) debido a varias razones. En primer lugar, porque son considerados como ácidos grasos y los humanos, animales y ciertos microorganismos pueden metabolizarlos como tal por medio de β -oxidación, oxidándose completamente a CO_2 y H_2O (Melnick et al., 1954; Kinderlerer y Hatton 1990; Sofos y Busta 1993). En segundo lugar, porque tienen un bajo nivel de toxicidad en mamíferos y no son mutagénicos ni teratogénicos *in vivo* ni *in vitro* (Walker, 1990; Stopforth et al., 2005). Y en último lugar, porque las concentraciones de sorbato que se usan en los alimentos normalmente no alteran el sabor ni el olor de los productos y normalmente no suelen reaccionar con los componentes de los alimentos (Lück et al., 2011). Todo esto ha hecho que la Organización Mundial de la Salud considere como aceptable la ingesta diaria de sorbato hasta 25 mg/Kg de peso corporal por día, cantidad superior frente la permitida para otros conservantes que se usan habitualmente.

2.1 Aplicaciones de los sorbatos en alimentos

El ácido sórbico y los sorbatos son conservantes de amplio espectro cuyo uso está muy extendido en alimentos, comida para animales, fármacos y cosméticos. Se incluyen en los alimentos por la adición directa a la mezcla de los ingredientes en la fabricación, la aplicación sobre su superficie o la incorporación del conservante en el material de envasado (Stopforth et al., 2005). Las cantidades que se añaden a los alimentos dependen del tipo de alimento y de la reglamentación de cada país. A día de hoy, el uso y cantidad de los aditivos alimentarios (incluidos los sorbatos) que se utiliza en España, está regulado por el Reglamento (CE) N°

1129/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 (Comisión Europea, 2011). En ellos, el ácido sórbico se denomina con el código E-200, y sus sales, sódica, potásica y cálcica con los códigos E-201, E-202 y E-203 respectivamente. En general, las dosis máximas permitidas en muchos de los productos suele ser de 0,2 % o 2000 mg/Kg o mg/l del producto (Tabla 4), añadidos solos o en combinación principalmente con ácido benzoico o sus sales (Stopforth et al., 2005). Normalmente, se usan mayores cantidades en aquellos alimentos a preservar que tengan un pH más alcalino (Lück et al., 2011). Las cantidades mencionadas anteriormente no alteran la calidad del alimento, pero niveles superiores podrían causar alteraciones del sabor y olor de los mismos (Stopforth et al., 2005); únicamente se permiten cantidades superiores cuando el método de aplicación tiene lugar sobre la superficie o el material de envasado (Thomas y Delves-Broughton, 2014).

Tabla 4. Dosis máxima permitida de ácido sórbico/sorbatos en diferentes tipos de alimentos de acuerdo al Reglamento (CE) N° 1129/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo.

Producto	Dosis máxima ^a (mg/l o mg/Kg)
Productos lácteos	1000
Queso	2000 (<i>quantum satis</i> *)
Emulsiones de grasas y aceites (Mayonesa, margarinas)	2000
Frutas y hortalizas frescas	20
Ensaladas preparadas	1500
Zumos	300-2000
Frutas y hortalizas secas	1000
Frutas y hortalizas en vinagre, aceite o salmuera	2000
Preparados de frutas y hortalizas, excepto compota	1000
Confituras, jaleas, mermeladas	1000-1500
Productos de confitería, rellenos, chicle	1500
Pan, Productos de bollería, pastelería, repostería y galletería	2000
Productos cárnicos secos, paté	1000 (<i>quantum satis</i> *)
Semiconservas de pescado y productos de la pesca	2000
Huevas de pescado	2000
Caldos y sopas	500
Salsas	2000
Bebidas aromatizadas	300
Cerveza, vino, sidra y otras bebidas alcohólicas	200

^aDosis máxima añadida, formada por únicamente ácido sórbico y sorbatos o una combinación con otros aditivos, principalmente ácido benzoico o sus sales

*Solo en tratamiento en superficie

Uno de los usos más importantes del ácido sórbico y sus sales es la utilización en quesos como agente antifúngico y para prevenir la formación de micotoxinas (Liewen y Marth, 1985; Stopforth et al., 2005) excepto en aquellos quesos en los que el sabor y la apariencia depende de los mohos (Stopforth et al., 2005; Thomas y Delves-Broughton, 2014).

Aunque la utilización de los sorbatos como conservantes de productos cárnicos está más extendida en países orientales, la legislación permite su uso en el tratamiento de las superficies de carnes secas para suprimir principalmente el crecimiento de mohos y bacterias patógenas. En el caso de los pescados, los sorbatos se añaden sobre su superficie para prevenir el crecimiento de mohos en preparaciones secas o ahumadas, bien solos o en combinación con otros métodos de conservación (Thomas y Delves-Broughton, 2014).

En productos vegetales frescos, fermentados o encurtidos, los niveles que se usan (máximo 0,2 %) no afectan a las bacterias lácticas y la fermentación de estos alimentos apenas se ve inhibida. Sin embargo, afectan al crecimiento de microorganismos no deseados como levaduras, mohos y otras bacterias (Lück, 1990; Stopforth et al., 2005). En los zumos de frutas los sorbatos se usan en combinación con otros métodos de conservación como la pasteurización o adición de sulfitos. En el caso de refrescos, se suele utilizar una combinación de sorbatos y benzoatos (Lück, 1990; Stopforth et al., 2005). En cuanto a los vinos, se pueden usar sorbatos en combinación con SO₂ para prevenir fermentaciones indeseadas durante su almacenamiento, prefiriéndose la sal sódica frente a la potásica ya que esta última puede precipitar en los vinos formando bitartratos.

Para controlar el deterioro de productos de panadería, como estos productos se obtienen por fermentación con levaduras, los sorbatos se añaden pulverizándose después de la fermentación para evitar efectos indeseados en las levaduras fermentativas (Stopforth et al., 2005). También se puede usar sorboyl palmitato, compuesto que no interfiere en la fermentación, pero que con el calor libera ácido sorbico para ejercer su actividad antimicrobiana durante el posterior almacenamiento (Sofos, 1989). En los productos que se obtienen por fermentación con levadura en polvo, los sorbatos pueden añadirse antes del proceso de fermentación, como es el caso de los productos de repostería, pastelería y galletería (Thomas y Delves-Broughton, 2014).

Los sorbatos también son frecuentes en emulsiones de grasas y aceites. En emulsiones con un mayor contenido en agua, como las mayonesas, se usa sorbato potásico, pero para el resto el ácido sórbico (Lück, 1990).

2.2 Acción antimicrobiana de los sorbatos

El ácido sórbico y sus sales son antimicrobianos de amplio espectro. Se denominan agentes fungistáticos o microbiostáticos porque, aunque a altas concentraciones pueden tener un efecto microbicida, las concentraciones que se usan en alimentos normalmente suelen inhibir el crecimiento de los microorganismos más que provocar su muerte (Stopforth et al., 2005) y fungistático porque además, su principal actividad antimicrobiana es frente a mohos y

levaduras. También tienen actividad, aunque con menor efectividad y menos estudiado frente a bacterias (Sofos, 1989).

Con respecto a las levaduras y los hongos, los sorbatos son efectivos frente a un gran número de especies (para una revisión ver Stopforth et al., 2005). En el caso de levaduras, las especies que inhiben pertenecen a los géneros *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Torulasporea*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* o *Zygosaccharomyces* entre otros. Respecto a los hongos, destacan géneros como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum* o *Trichoderma* en los que los sorbatos retrasan tanto la germinación de las esporas como el crecimiento micelial (Thomas y Delves-Broughton, 2014). En cuanto a bacterias, los sorbatos inhiben el crecimiento, multiplicación y germinación de esporas de especies tanto Gram positivas como negativas, catalasa positivas o negativas, aerobias o anaerobias, mesófilas o psicrófilas y patógenas o deteriorantes (Stopforth et al., 2005).

2.2.1 Teoría clásica de los ácidos débiles y mecanismos de acción del ácido sórbico

El ácido sórbico y sus sales pertenecen al grupo comúnmente denominado como conservantes ácidos débiles, entre los que se encuentran el ácido benzoico, el ácido acético o el ácido propiónico, entre otros. A pesar de su variabilidad en cuanto a estructura química, a lo largo de la historia se ha aceptado que comparten el mismo modo de acción siguiendo la denominada teoría clásica de acción de los ácidos débiles propuesta inicialmente por Neal et al., en 1965 para

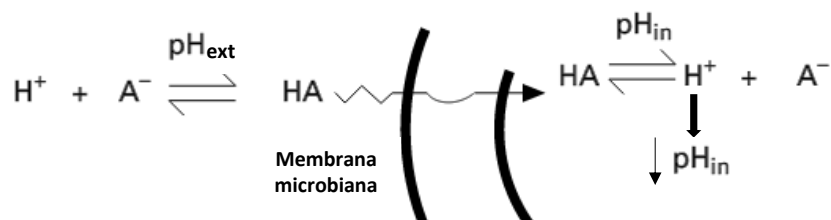


Figura 1. Equilibrio pH dependiente de los ácidos débiles dentro y fuera de la célula microbiana. Las moléculas sin disociar (HA) son las únicas que pueden atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva. Una vez en el citoplasma se disocia en aniones (A^-) y cationes (H^+). Los H^+ ocasionarían el descenso del pH intracelular (Modificación de Lambert y Stratford, 1999).

el modo de acción del ácido acético frente a levaduras (Krebs et al., 1983; Salmond et al., 1984). Estos ácidos en solución se encuentran en equilibrio dinámico entre la forma sin disociar (sin carga) y sus respectivos aniones (A^-) y protones (H^+) (Stratford y Anslow, 1996). Dado que este equilibrio es pH dependiente (Figura 1) y que los ácidos débiles tienen valores de pK_a entre 4,20

Tabla 5. Porcentaje de ácido sórbico disociado y sin disociar a diferentes pHs del medio. Calculados con la ecuación de Henderson-Hasselbalch y el valor pK_a de ácido sórbico de 4,75.

pH	% forma disociada	% forma sin disociar
10	99,999	0,001
9	99,994	0,006
8	99,942	0,058
7	99,427	0,58
6	94,558	5,442
5.6	87,371	12,629
5	63,474	36,526
4,75	50,000	50,000
4	14,805	85,195
3	1,708	98,292
2	0,173	99,837

y 4,75, los pHs ácidos favorecen la forma sin disociar (HA) y los pHs neutros o básicos las formas totalmente disociadas (Tabla 5 para el ácido sórbico) (Liewen y Marth, 1985). Se considera que el ácido sin disociar posee realmente la actividad antimicrobiana ya que es la forma liposoluble capaz de atravesar rápidamente, por difusión pasiva, la membrana plasmática y entrar dentro de la célula (Liewen y Marth, 1985; Stratford y Rose, 1986; Fleet, 1992). Una vez dentro, como causa del pH cercano a la neutralidad del citoplasma, el ácido débil se disocia en sus aniones y cationes (Figura 1), los cuales al estar cargados, no son moléculas liposolubles lo que impide que vuelvan a atravesar la membrana plasmática, concentrándose en el interior celular (Lambert y Stratford, 1999). La acumulación interna del anión provocaría un aumento de la presión de turgencia e influiría en la producción de radicales libres llevando a la célula a un fuerte estrés oxidativo, aunque los estudios más recientes demuestran que los aniones podrían inducir una respuesta protectora en *S. cerevisiae* mediante la síntesis de bombas de expulsión de aniones (Piper et al., 2001; Piper, 2011). Aún así, el efecto inhibitorio de los ácidos débiles se ha atribuido tradicionalmente a la acumulación intracelular del anión y la acidificación del citoplasma (Piper et al., 2001). Se ha descrito que dicha acidificación causaría una serie de alteraciones en el metabolismo celular y, dependiendo del tipo de microorganismo, este se vería afectado por una o varias alteraciones. En general, la acidificación por ácidos débiles ocasiona una inhibición de varios sistemas enzimáticos implicados en el transporte, metabolismo celular y alteraciones en la morfología celular, crecimiento y replicación (Stopforth et al., 2005).

Con respecto al metabolismo, en levaduras el ácido sórbico inhibe enzimas de la glicolisis y del ciclo de Krebs, lo cual desencadena una represión de los procesos de respiración y fermentación en *S. cerevisiae* (Krebs et al., 1983; Cheng y Piper, 1994; Pearce et al., 2001); una disfunción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la inhibición del sistema catalasa/peroxidasa, lo que origina un aumento drástico de la producción de radicales libres de oxígeno (Piper, 1999; Lück et al., 2011). Esto conduce a las células un fuerte estrés oxidativo y a un estado de crisis energética (Piper et al., 2001; De Nobel et al., 2001; Mollapour et al., 2004).

En cuanto al transporte de nutrientes a través de la membrana celular, la consecuente falta de ATP afectara directamente al transporte de carbohidratos, aminoácidos y otros nutrientes (Deák y Novak, 1972; Sofos y Busta, 1993). A veces se especifica que el ácido sórbico sin disociar actuaría como un protonóforo que liberaría protones en el interior celular (Ronning y Frank, 1987), disminuyendo el gradiente de protones a través de la membrana y neutralizando la fuerza protonmotriz necesaria para la captación de sustratos como el transporte de aminoácidos o cetoácidos (Sofos y Busta, 1993).

El ácido sórbico bajo ciertas condiciones, también produce cambios en la morfología y apariencia de las células microbianas y a nivel intracelular, la aparición de núcleos irregulares y la presencia de un mayor número de diferentes tamaños de mitocondrias (Sofos y Busta, 1993).

2.2.3 Modificaciones de la Teoría clásica de acción de los ácidos débiles

Desde finales del siglo pasado se empezó a cuestionar que el mecanismo de acción del ácido sórbico siguiera estrictamente la teoría clásica de acción de los ácidos débiles (Stratford y Anslow, 1998). Esta teoría sugiere que todos los ácidos débiles con idéntico pK_a , e independientemente de su estructura, son igual de efectivos a las mismas concentraciones; es decir, deben disminuir el pH intracelular al mismo nivel (Stratford et al., 2009). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que, en el caso de esporas de *A. niger* y en células de *S. cerevisiae*, a pH 4 la cantidad de protones liberados por el ácido sórbico en el interior celular es bastante menor si se compara con el ácido acético (ambos pK_a de 4,75) provocando un descenso del pH intracelular, de 7 a 4,5 para el acético y hasta 6,3 con ácido sórbico. Esto explica por qué la CMI para ambos ácidos débiles es tan diferente, 3 mM para el sórbico y próximo a 100 mM para el acético (Stratford y Anslow, 1998; Stratford et al., 2009; Stratford et al., 2013a).

A partir del estudio de Stratford y Anslow de 1996 en el que observaron que la presencia de sorbato a un pH extracelular igual al intracelular ya ocasionaba una disminución del crecimiento exponencial, los investigadores empezaron a postular que la acidificación intracelular no debe ser el principal mecanismo causante de la actividad antimicrobiana del ácido sórbico y que dichos conservantes deben tener otro sitio de acción. Se ha postulado que, en base al elevado coeficiente de partición del ácido sórbico respecto a otros ácidos débiles como el acético, el primer sitio de acción del ácido sórbico sería la membrana plásmática como ocurre con otros alcoholes, aldehídos y ácidos de también 6 átomos de carbono (Stratford y Anslow, 1998; Stratford et al., 2009; Stratford et al., 2013a; Ter Beek et al., 2015). De esta forma se especula que el ácido sórbico podría incorporarse en ella alterando su fluidez como en el caso del etanol (Jones y Greenfield, 1987), inhibiendo proteínas y transportadores de membrana (Sofos y Busta,

1993; Melin et al., 2008), aumentando la permeabilidad de los protones como se ha descrito en otros hidrocarburos lipofílicos (Sá-Correia y Van Uden, 1986) o generando agujeros en ella (Freese y Levin, 1978). Se especula que el ácido benzoico tendría también una acción híbrida entre la liberación de protones en el interior celular y otro mecanismo (Burlini et al., 1993; Stratford y Anslow, 1998).

2.3 Mecanismos propuestos de resistencia a sorbatos

La resistencia de las levaduras a los sorbatos depende de muchos factores como la especie, cepa, concentración de sorbato, pH, inóculo, temperatura de almacenamiento y sobre todo, de la previa exposición a sorbato (Sofos, 1989). Las especies del género *Zygosaccharomyces*, como *Z. bailii*, *Z. lentus* y *Z. rouxii* son tres de las especies más importantes desde el punto de vista de resistencia a ácidos débiles por su capacidad de crecer hasta altos niveles de sorbato a pHs por debajo de su pK_a (Fleet, 1992). *Z. bailii* y *Z. rouxii* son capaces de crecer hasta 6 g/l a pH 4, cuando la mayoría de levaduras a ese pH se inhiben a 100-200 mg/l de sorbato (Deák, 2008; Martorell et al., 2007). *S. cerevisiae* suele resistir menores cantidades de sorbatos que las anteriores especies.

Uno de los principales factores que condiciona la resistencia a sorbatos es la previa exposición a bajas concentraciones de estos compuestos (Bills et al., 1982; Sofos, 1989). En cultivos de *S. cerevisiae*, inmediatamente después de la adición sorbato o benzoato a 0,5-2,5 mM, las células salen del ciclo celular y entran en un largo periodo de “éxtasis celular”. Las células que después de un tiempo (que depende de la severidad de las condiciones) son capaces de reanudar el crecimiento, se dice que son células preadaptadas porque empezarán a crecer sin retraso si se reinoculan en el mismo medio (Piper et al., 1997, 1998). Un estudio reciente pone de manifiesto además, que cuando una población es resistente a un ácido, presenta resistencia cruzada frente a otros ácidos débiles o una combinación de ellos (Stratford et al., 2013b).

La adaptación implica la expresión de ciertos genes. En *S. cerevisiae* las respuestas que se originan tras la exposición a ácidos sórbico, principalmente son de respuesta general a estrés, particularmente estrés oxidativo que se producen por la activación de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p (De Nobel et al., 2001; Schüller et al., 2004). En *C. glabrata* sin embargo, la presencia del ácido activa la vía de respuesta a glicerol, siendo la MAP-Kinasa de esta vía, CgHog1, la que desencadena posteriormente las respuestas frente a este estrés (Jandric et al., 2013). Durante el tiempo de “éxtasis celular” o de latencia, las células además de activar estas respuestas generales frente a estrés, también deben poner en marcha algunos de los

siguientes mecanismos de resistencia y así recuperar las condiciones internas más adecuadas para restaurar de nuevo su crecimiento (Mira et al., 2010a).

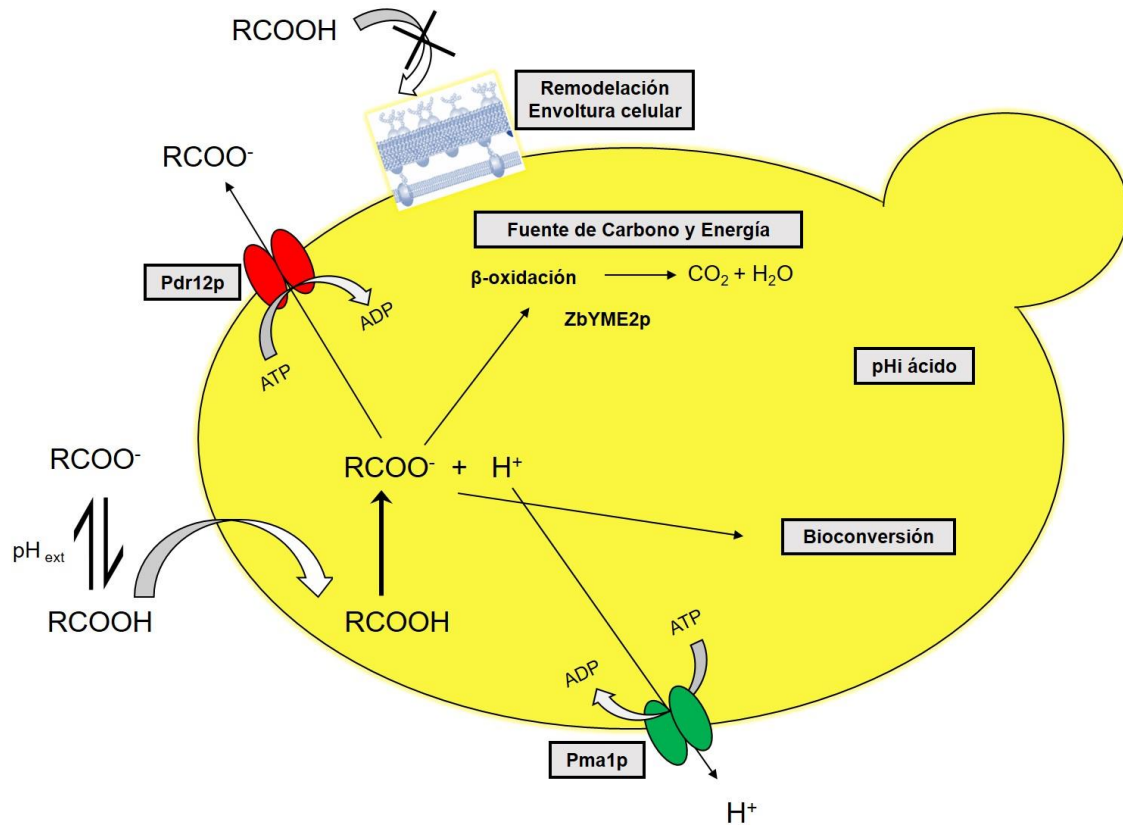


Figura 2. Principales mecanismos de resistencia frente a ácido sórbico en microorganismos. El ácido sin disociar del exterior de la célula entra por difusión pasiva a través de la membrana plasmática y una vez dentro se disocia en su correspondiente anión y protón. El protón será expulsado a través de la ATPasa, Pma1, con gasto de ATP, del mismo modo que el anión con el transportador Pdr12. Algunos microorganismos pueden utilizar los sorbatos como fuente de carbono y energía por medio de una β-oxidación inicial o como única fuente de carbono en *Z. baillii* gracias a la enzima ZbYME2p. Algunas células de *Z. baillii* impiden la entrada del conservante al tener un pH intracelular más ácido que las células sensibles. Otros microorganismos pueden convertir el ácido hacia un compuesto sin actividad inhibitoria y se especula que algunos pueden activar una remodelación de la pared o membrana plasmática para impedir la entrada del conservante (Modificación de Piper, 2011).

2.3.1 ATPasa-H⁺ (Pma1p)

La ATPasa-H⁺ es una proteína de la membrana celular que aparece en muchos microorganismos y plantas. En el caso de levaduras, está especialmente estudiada en *S. cerevisiae* siendo una de las más abundantes en su membrana plasmática y constituyendo un 20 % del total de las proteínas presentes en ella (Serrano, 1984). Es esencial para la viabilidad porque su principal función es la de mantener el pH intracelular y el potencial electroquímico de la membrana por

medio de la expulsión del exceso de protones (Piper et al., 1997). Esta proteína gasta una molécula de ATP por cada H^+ que expulsa (Figura 2) (Lambert y Stratford, 1999), lo que implica que en *S. cerevisiae* este transportador consume del 20 % del ATP producido en condiciones celulares normales o hasta el 60 % en presencia de ácidos débiles (Holyoak et al., 1996). En comparación con *S. cerevisiae*, en *Z. bailii* esta ATPasa aparece en menor cantidad en presencia de ácidos débiles (Piper et al., 2001). En *S. cerevisiae* las condiciones que provocan un descenso del pH intracelular, como es la presencia de sorbatos, inducen fuertemente la expresión de esta ATPasa (Holyoak et al., 1996; Piper et al., 2001) por lo que se considera uno de los principales mecanismos de resistencia a sorbatos (Ullah et al., 2012). Hay ciertos estudios que indican que la ATPasa- H^+ presente en las membranas vacuolares, también sería crucial para la homeostasis del pH intracelular en presencia de estrés por sórbico u otros ácidos débiles (Mollapour et al., 2004; Makrantonis et al., 2007; Martínez-Muñoz y Kane, 2008; Mira et al., 2010a).

2.3.2 Transportador de aniones Pdr12p

La proteína Pdr12 es un transportador de membrana de tipo ABC (*Cassette* de unión a ATP) que pertenece al grupo de transportadores relacionados con resistencia a multidrogas (MDR) implicados en la tolerancia de las levaduras frente a diferentes ácidos débiles. Este transportador participa en la extrusión activa fuera de la célula de los aniones de algunos de estos ácidos de cadena corta, como el sorbato, benzoato o propionato (Figura 2) (Holyoak et al., 1999; Piper et al., 1998). Junto con las ATPasas- H^+ , el transportador Pdr12 es una de las proteínas más abundantes en la membrana plasmática inducidas por la presencia de ácido sórbico (Piper et al., 2001). De hecho, la expulsión de estos aniones compensa el protón liberado por las ATPasas y por tanto, ambos transportadores ejercen una acción combinada y esencial para mantener el potencial de membrana y restaurar la homeostasis de *S. cerevisiae* frente a ácidos débiles hasta el punto donde se pueda reanudar el crecimiento (Piper et al., 2001; Piper, 2011). El uso de ambos transportadores para resistir este estrés es muy caro energéticamente (2 ATPs por cada molécula de conservante) lo que genera una dramática reducción en el rendimiento de producción de biomasa (Stratford y Anslow, 1996; Piper et al., 1997; Piper, 2011).

El origen de la presencia del transportador Pdr12 en la membrana plasmática ante el estrés por ácidos débiles parece ser el anión que se acumula en el citoplasma, el cual activa el factor de transcripción War1 en *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Kren et al., 2003; Schüller et al., 2004; Lebel et al., 2006) y éste a su vez activa la transcripción de Pdr12 (Kren et al., 2003; Piper, 2011). En el caso de *Z. bailii*, no se han descrito secuencias homólogas a Pdr12 y War1 (Mollapour et al., 2008) ni una fuerte inducción de transportadores de ácidos débiles (Piper et al., 2011). A pesar

de que el transportador Pdr12 se considera un sistema específico de levaduras frente al estrés por ácidos débiles, su inducción no parece ser suficiente para adquirir resistencia frente a ellos (Papadimitriou et al., 2007).

2.3.3 Fuente de Carbono y Energía

El ácido sórbico y los sorbatos son considerados como ácidos grasos y por tanto los humanos, animales y ciertos microorganismos pueden metabolizarlos como tales por medio de β -oxidación hasta CO_2 y H_2O (Figura 2). En microorganismos, esta actividad se ha detectado en hongos del género *Penicillium*, bacterias pertenecientes a *Acetobacter*, *Lactobacillus*, o *Streptococcus lactis* y levaduras del género *Candida* como *C. clausenii*, *C. pseudotropicalis* y *C. utilis* (Melnick et al., 1954; Deák y Novak, 1972; Liewen y Marth, 1985; Kinderlerer y Hatton 1990; Sofos y Busta 1993).

Z. bailii tiene la peculiaridad de poseer la enzima ZbYME2 que codifica para una monooxigenasa mitocondrial con actividad benzoato-4-hidrolasa, la cual le permite degradar en presencia de oxígeno, sorbato, benzoato y otros ácidos débiles no aromáticos como única fuente de carbono (Mollapour y Piper, 2001a). La presencia de dicha enzima hace que *Z. bailii* sea una de las especies más resistente a ácidos débiles porque no tiene que gastar mucha energía en extruir los protones y aniones del conservante disociado (Piper et al., 2001). La secuencia nucleotídica de ZbYME2 presenta un 74 % de similaridad con la secuencia de la proteína Yme2p de *S. cerevisiae*, sin embargo esta última enzima no posee actividad hidrolasa, lo que ocasiona que *S. cerevisiae* no pueda utilizar benzoato ni sorbato como única fuente de carbono (Piper et al., 2001; Mollapour y Piper, 2001b).

2.3.4 Alteración o mantenimiento del pH intracelular

Se han propuesto otros tipos de mecanismos responsables de la resistencia de ciertas cepas a ácidos débiles. En primer lugar se propuso en *Z. bailii* y *S. cerevisiae* el aumento de la capacidad tampón del citoplasma de las células expuestas a este tipo de conservantes como mecanismo para tolerar la disminución del pH interno (Warth, 1988; Ullah et al., 2013) o una producción de solutos compatibles como polioles que protegen el sistema enzimático celular del cambio de pH (Bills et al., 1982).

Un estudio reciente pone de manifiesto que la resistencia de *Z. bailii* frente a sórbico, benzoico o acético es debido a la existencia de una pequeña subpoblación de células que presentan un menor pH citoplásmico que las células sensibles a estos ácidos débiles, generando una menor

captación y disociación de estos conservantes en el interior celular. También se ha demostrado que esta extrema resistencia no es heredable genéticamente, únicamente es un ejemplo de heterogeneidad fenotípica dentro de la población, porque cuando dichas células se colocan en un medio sin ácido sórbico, la población total revierte la habilidad de crecer a altas concentraciones de este conservante (Stratford et al., 2013b).

2.3.5 Remodelación de la envoltura celular

La expulsión activa del anión y del protón generados por la disociación de los ácidos débiles en el interior celular son procesos de un gran gasto energético para la célula. Además, una vez expulsados podrían reasociarse y difundir de nuevo al interior celular, lo que ha dado lugar a que este proceso se considere como un ciclo inútil y las nuevas investigaciones se centren en dar más importancia a otros tipos de mecanismos de resistencia no tan costosos (Mira et al., 2010b; Ullah et al., 2013). A partir del descubrimiento de que células preadaptadas a benzoato tienen una menor permeación a este conservante (Warth, 1989), algunos autores han contemplado un posible mecanismo de resistencia alternativo, como la remodelación de la estructura o composición tanto de la pared como de la membrana celular de las levaduras. Estos cambios implicarían la limitación de la entrada por difusión pasiva de estos ácidos principalmente, pero todavía no se conocen con exactitud.

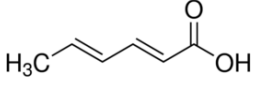
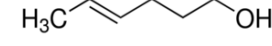
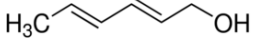
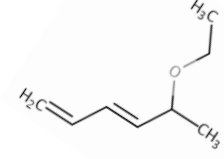
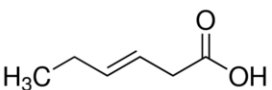
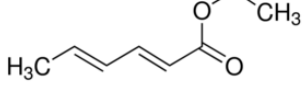
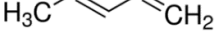
Mollapour et al., en 2004 realizó un estudio de mutantes por delección en *S. cerevisiae* y detectó que aquellos sensibles a sorbato, entre otros muchos, presentan defectos en la pared celular, en las proteínas de la membrana plasmática o en su composición lipídica. Con respecto a la pared celular, se ha descrito que las manoproteínas (De Nobel y Barnett, 1991) y la expresión de *Spi1p* en *S. cerevisiae* (codifica para una proteína de pared celular de tipo glicosilfosfatidilinositol) en presencia de ácidos débiles muy lipofílicos (Simoes et al., 2006) pueden producir un reforzamiento de su estructura disminuyendo la porosidad de la pared celular y por consiguiente la entrada de ácidos débiles (Piper et al., 2001).

En cuanto a la membrana plasmática se ha determinado que la biosíntesis de ergosterol es un proceso importante para la resistencia a ácido sórbico, de hecho los genes *ERG3*, *ERG4* o *ERG24* son esenciales para la resistencia a varios ácidos débiles (Mollapour et al., 2004; Mira et al., 2010b). Además, la correcta actividad de la proteína Pdr12 parece depender de interacciones moleculares específicas con ergosterol de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Souza et al., 2011).

2.3.6 Bioconversión

El ácido sórbico y sus sales contienen un grupo carboxilo que es la parte más reactiva del ácido y la que le confiere a la molécula la actividad microbicida (Stopforth et al., 2005). Dentro de los posibles mecanismos de resistencia propuestos frente a estos conservantes, muchos microorganismos han desarrollado sistemas para suprimir este grupo por medio de reacciones de esterificación, reducción, formación de alcoholes, de éteres y descarboxilaciones, de manera

Tabla 6. Comparación de la estructura de los derivados del ácido sórbico obtenidos por la acción de microorganismos. Estos compuestos producen mal olor y sabor en ciertos productos.

Compuesto	Estructura	Microorganismo productor	Alimentos	Bibliografía
Precursor: Ácido sórbico				
4-Hexenol		<i>Mucor</i> sp.	Vinos	Kuroguchi et al., 1974; 1975
2,4-Hexadienol o alcohol sórbico				
2-Ethoxy hexa-3,5-dieno		Bacterias lácticas <i>Mucor</i> sp.	Vinos	Kuroguchi et al., 1975; Crowell y Guymon, 1975; Chisholm y Samuels, 1992
Ácido 4-Hexenoico		<i>Geotrichium</i> sp. Bacterias lácticas	Vegetales fermentados, Yamagobuz uke japonés	Kuroguchi et al., 1974; Kuroguchi et al., 1975; Casado et al., 2010; Montañaño et al., 2013
Etil sorbato		<i>Geotrichium</i> sp. o reacción directa con alcohol	Vinos	Crowell y Guymon, 1975; de Rosa et al., 1983; Chisholm y Samuels, 1992
1,3-Pentadieno		Hongos y levaduras	Quesos, mazapán, refrescos, etc.	Casas et al., 1996, 1999, 2004; Marth et al., 1966

que detoxifican en parte su ambiente convirtiendo el sorbato en un compuesto que no afecta a su crecimiento (Kinderler y Hatton, 1990). Este tipo de conversiones, por lo general, se producen

a altas concentraciones de inóculo y concentraciones subinhibitorias de ácido sórbico (Stopforth et al., 2005).

Se han identificado distintos productos volátiles derivados del ácido sórbico (Tabla 6) producidos por mohos, levaduras o bacterias lácticas y que provocan una disminución de la calidad en aquellos productos donde se generen. Dentro de ellos se ha descrito la producción de 2,4 hexadienol o alcohol sórbico, precursor del mal olor a geranio que puede apreciarse ocasionalmente en vinos que son tratados con ácido sórbico (Edinger y Splittstoesser, 1986). Este olor proviene de la reacción del alcohol sórbico con etanol hasta formar el verdadero compuesto que da este olor, el éter 2 ethoxy hexa-3,5 dieno (Crowell y Guymon, 1975). En muchos vinos que contienen sorbatos también se ha descrito la presencia de otros compuestos. El más común, el etil sorbato que huele según los autores a piña/apio y según otros a miel/manzana (Crowell y Guymon, 1975; de Rosa et al., 1983; Chisholm y Samuels, 1992). También el 1 ethoxy hexa-2,4 dieno, produce el rechazo de los vinos por su olor descrito a menta o ajo (Kindeler y Hatton, 1990; Chisholm y Samuels, 1992). Otros ejemplos se muestran en la Tabla 6.

3. Principales signos de deterioro de alimentos

Dos de los signos más importantes que anticipan que en un alimento o bebida se ha producido el crecimiento y el consecuente deterioro por levaduras, es cuando se detecta la producción de CO₂, bien por la producción de burbujas o el hinchamiento de los envases, y cuando se detectan olores y sabores desagradables en ellos.

3.1 Malos olores y sabores en alimentos

El término en inglés *off-flavours* hace referencia a olores o gustos atípicos como resultado de un cambio interno del alimento debido a una alteración microbiológica, reacciones químicas de componentes del alimento como oxidaciones y reacciones enzimáticas endógenas (Saxby, 1993; Ridgway et al., 2010). Estos se pueden originar a partir de cualquier parte de la cadena de producción y de suministro (Figura 3). Los originados como consecuencia de una alteración microbiológica se deben al propio crecimiento de microorganismos deteriorantes y a la generación de ciertos compuestos químicos como consecuencia de su metabolismo primario o secundario, al metabolismo a partir de compuestos del alimento o por actividad enzimática residual (Ridgway y Lalljie, 2011). Adicionalmente a los malos olores generados a partir de ácidos

sórbicos y sus sales mencionados en la Tabla 6, existen otros malos olores y sabores de origen microbiológico que aparecen en los alimentos y bebidas recopilados en la revisión de Ridgway et al., en 2010.

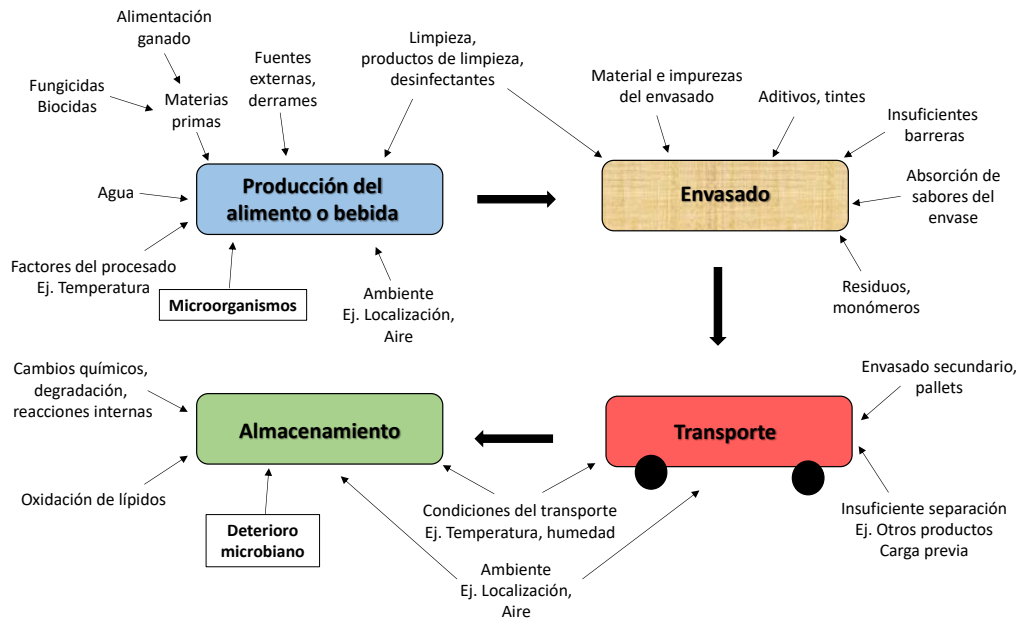


Figura 3. Posibles causas del origen de los malos sabores y olores que pueden ocurrir en toda la cadena de producción y suministro (Modificación de Ridgway, 2015).

En productos cárnicos la mayor causa de malos olores y sabores es la contaminación microbiana superficial, originándose inicialmente ciertos olores a dulce, afrutado o mantecoso y, posteriormente, según aumenta el tiempo de almacenamiento, compuestos de azufre que dan un olor a podrido. En pescado se desarrollan olores a amoníaco, a fruta y a compuestos de azufre, además de olores a tierra o humedad. El pescado fresco puede incluso absorber malos olores y sabores de metabolitos microbianos del agua (Wilkes et al., 2000). En leche y productos derivados son característicos los olores y sabores a rancio, ácido o dulce. Las frutas y los vegetales son más resistentes al deterioro microbiano que los productos cárnicos, pero aun así también pueden registrar olores a tierra o a mantecoso (Ridgway et al., 2010; Ridgway y Lalljie, 2011).

La mayoría de los compuestos que producen estas percepciones olfativas en alimentos están producidos por bacterias y hongos contaminantes de alimentos. Sin embargo las levaduras también juegan un papel importante en su producción. *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae*, o *Dekkera/Brettanomyces* son de las especies más importantes en deterioro de alimentos por olores y sabores desagradables debido al olor a rancio de los ácidos grasos que liberan las primeras en quesos o carnes (Groenewald et al., 2014) y a los compuestos fenólicos que

producen las dos últimas en bebidas alcohólicas (Vanbeneden et al., 2008). *P. membranifaciens* es capaz de generar compuestos como acetaldehído y etilacetato que provocan sabores afrutados o avinagrados por producción de ácido acético (Stratford, 2006). *S. cerevisiae* junto con *D. hansenii* y *Z. rouxii*, son las principales levaduras responsables de olores tipo plástico o petróleo como la producción de 1,3-pentadieno o estireno generados a partir de conservantes que se añaden a los alimentos. La producción de etanol por las levaduras fermentativas deteriorantes de alimentos desencadena un sabor u olor a alcohol. Este es uno de los principales y más frecuentes deterioros, ya que se produce en cantidades equimoleculares con el CO_2 .

3.2 Hinchamiento o producción de CO_2

Las levaduras son microorganismos quimioheterótrofos capaces de crecer en una gran cantidad de fuentes de carbono, como alcoholes, aminoácidos y hasta lípidos. Sin embargo, los carbohidratos son su fuente de carbono más importante de cara a sus aplicaciones biotecnológicas. Las levaduras pueden crecer sobre una gran cantidad de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (Barnett et al., 2000; Dickinson y Kruckeberg, 2006).

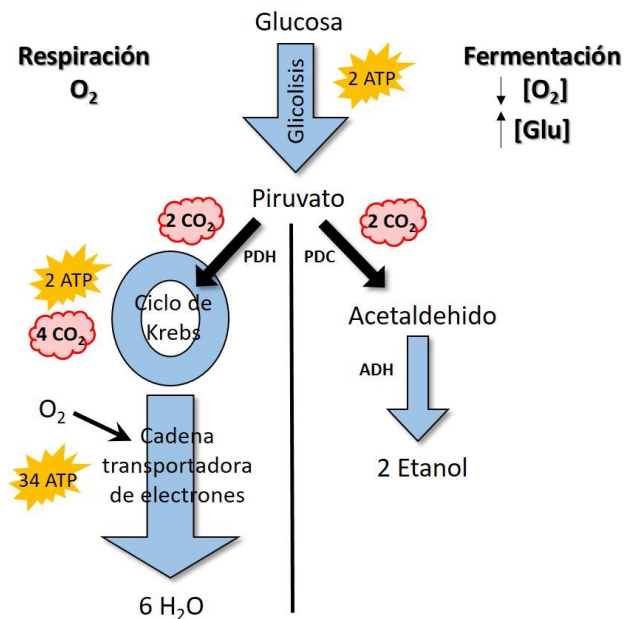


Figura 4. Esquema de la respiración y fermentación de azúcares que ocurre en levaduras. Inicialmente se realiza la glicólisis y después, en función de la concentración de oxígeno y de glucosa, la ruta continúa hacia la respiración con el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones hasta formar CO_2 y H_2O , o por la fermentación hasta formar CO_2 y etanol.

Los azúcares son metabolizados por la vía glicolítica hasta piruvato y después pueden seguir dos opciones, la respiración aerobia través del ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones hasta formar CO_2 y agua, o, por otro lado, la vía fermentativa hasta formar etanol y CO_2 (Figura 4).

El hecho de que los azúcares sean fermentados u oxidados depende de la concentración de oxígeno y de glucosa presente. Si hay mucho oxígeno disponible, normalmente se inhibe la fermentación (Efecto Pasteur). Si por el contrario la concentración de glucosa es alta, se inhibe la respiración (Efecto

Crabtree) porque la glucosa induce la expresión de la Piruvato Descarboxilasa (PDC en Figura 4) que conlleva a la fermentación alcohólica y reprime la expresión de la Piruvato Deshidrogenasa (PDH en Figura 4) que conduce a la respiración (Deák y Beuchat, 1996; Dickinson y Kruckeberg, 2006). Cuando la concentración de piruvato es baja (a baja concentración de glucosa), debido a que la PDH tiene 10 veces más afinidad por piruvato que la PDC, se produce la respiración (Pronk et al., 1996). Todo esto hace que las levaduras sean microorganismos muy versátiles ambientalmente ya que tienen la capacidad de cambiar su metabolismo de respiración a fermentación y viceversa en función de la concentración de oxígeno y azúcares presentes.

Los alimentos y bebidas son una fuente importante de azúcares, lo que les hace previsiblemente un buen hábitat para el crecimiento de levaduras. Los problemas por exceso de gas en ellos se deben a la fermentación de los azúcares por estos microorganismos. Sin embargo, el número de azúcares fermentables así como el volumen de gas producido varía entre las especies de levadura (Stratford, 2006). Una gran parte de las levaduras conocidas tienen un metabolismo estrictamente aerobio como *Rhodotorula* y *Cryptococcus* spp. las cuales no suelen desencadenar problemas por exceso de gas. Las que si generan problemas son las fermentativas facultativas que pueden crecer tanto oxidativa como fermentativamente y las estrictamente fermentativas como *Kazachstania slooffiae*. Dentro de las fermentativas facultativas, existen otra clasificación que agrupa por un lado a las especies Crabtree positivas que pueden fermentar en condiciones aeróbicas siempre que la disponibilidad de azúcar esté por encima de un determinado valor, y por otro lado las Crabtree negativas, que apenas fermentan en condiciones aeróbicas. Entre las Crabtree positivas destacan *S. cerevisiae* y *S. pombe* las cuales muestran una clara preferencia al metabolismo fermentativo y dentro de las Crabtree negativas destacan *C. utilis*, *K. marxianus*, *K. lactis* y *H. uvarum* (Deák y Beuchat, 1996; Gonzalez et al., 2013).

En el proceso de fermentación los azúcares se convierten principalmente en etanol y CO₂ en cantidades equimoleculares lo que origina una pérdida de dulzura y la adquisición de un sabor y aroma a alcohol o “mala cerveza o vino” del producto. En paralelo también se forman otros metabolitos como glicerol, ésteres, aldehídos, ácidos, etc. en baja concentración pero que pueden tener un impacto sensorial en el producto (Fleet, 2011).

La producción de gas por levaduras en alimentos o bebidas puede dar lugar a diferentes intensidades del problema. En primer lugar la aparición de simples burbujas en los alimentos, como ocurre en mermeladas o yogures ecológicos contaminadas con *W. anomalus* y *M. guilliermondii* (Stratford, 2006; Wrent et al., 2015a), en carne envasada al vacío de donde se aisló *Kazachstania psychrophila* (Kabisch et al., 2016) y por *Candida cretensis* en chorizos (Quirós

et al., 2008). Las especies menos fermentativas, como las ya mencionadas, son las que dan lugar a la producción de CO₂ hasta 2 atmósferas de presión. Dicha presión no es suficiente como para romper los envases de los alimentos pero sí para generar burbujas y un sabor tipo champán (Stratford, 2006). En segundo lugar, se puede producir un hinchamiento tal de los envases que pueden llegar a deformar o incluso romper latas o botellas de vidrio. La cantidad de CO₂ producido aumenta considerablemente a mayor contenido de azúcares (Martorell et al., 2007). *D. bruxelensis*, *Z. bailii* y *S. cerevisiae* son especies muy fermentativas que ocasionalmente han llegado a formar de 6 a 10 atmósferas de sobrepresión en bebidas no alcohólicas (Stratford, 2006), como ha ocurrido en un caso destacado de botellas que contenían un suplemento de hierbas secas (Rossi et al., 2010).

4. Modelos predictivos de crecimiento

La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de poblaciones microbianas a factores ambientales definidos y controlados, son reproducibles y predecibles (McMeekin et al., 2002; Braun y Sutherland, 2006). Los modelos predictivos están compuestos por ecuaciones matemáticas con diversos parámetros propios de el/los microorganismo(s) participantes y las condiciones de estudio (Braun y Sutherland, 2006) con los que se puede pronosticar *a priori* la evolución cuantitativa de poblaciones microbianas a lo largo del tiempo en condiciones similares (Wilson et al., 2002).

La microbiología predictiva se empezó a aplicar en procesos térmicos de alimentos para controlar el crecimiento de ciertas bacterias implicadas en diferentes enfermedades (McMeekin et al., 2007). A partir del uso por primera vez de modelos predictivos para estudiar el deterioro microbiano de carnes (Scott, 1937) y más recientemente con el auge de la tecnología informática, la microbiología predictiva se desarrolló más rápidamente. Esto despertó el interés de investigadores, productores de alimentos e inspectores de seguridad en los modelos predictivos (Skandamis y Jeanson, 2015), como una herramienta viable, rápida y económica, en comparación con los métodos tradicionales microbiológicos, para estimar la vida útil y la seguridad de los alimentos desde el punto de vista de microorganismos patógenos y deteriorantes (McMeekin et al., 2002). Los modelos también se usan para el análisis de puntos críticos en los sistemas APPC, en evaluaciones de riesgo cuantitativas de microorganismos a lo largo de la cadena de producción (producción, almacenamiento y distribución), en investigación y desarrollo de productos, y en enseñanza del comportamiento microbiano (McMeekin et al., 2010). Tantas son sus aplicaciones, que se han financiado proyectos gubernamentales

nacionales e internacionales en Europa, Estados Unidos y Australia para desarrollar modelos y bases de datos aplicables en el control de la calidad e inocuidad alimentaria. Dos ejemplos son los proyectos europeos FAIR CT98-4083 o el FAIR CT97-3129 que han servido para desarrollar bases de datos y modelos predictivos de deterioro de alimentos perecederos para las industrias de alimentos y autoridades regulatorias el primero, y para desarrollar y unificar modelos predictivos en alimentos estructurados el segundo (Wilson et al., 2002; Braun y Sutherland, 2006).

En todos los problemas de deterioro, la causa raíz es el crecimiento de la población microbiana en el alimento, que puede estar acompañada o no de una alteración de las características organolépticas de los alimentos (descritas en apartado 3.1). Este crecimiento se manifiesta en muchas ocasiones, con la aparición de biomasa microbiana en forma de colonias o biopelículas en la superficie de los alimentos (Wilson et al., 2002). El crecimiento microbiano se puede describir y estimar utilizando los modelos matemáticos que aporta la microbiología predictiva, para cuantificar el aumento de la población, su inhibición y su muerte. Sin embargo, como se detallará en el capítulo 1, todos estos modelos se han desarrollado a partir de cultivos líquidos y, cada vez son más los estudios que demuestran que no es fiable extrapolar directamente estos datos a alimentos o medios sólidos debido a las diferencias en el crecimiento. Parece por tanto conveniente desarrollar modelos predictivos a partir de datos obtenidos en medio sólido, con el propósito de que las predicciones sean más exactas y precisas, es decir más fiables. Para ello revisaremos en primer lugar los modelos matemáticos disponibles más usados y la utilidad de su aplicación.

4.1 Tipos de modelos

Existen diferentes formas de clasificar los modelos predictivos (Figura 5). Los modelos **cinéticos**, estiman el tiempo requerido para el crecimiento específico o la respuesta de inactivación bajo ciertas condiciones, muy útiles para abordar predicciones de vida media de productos (Skandamis y Jeanson, 2015), ya que permiten calcular el periodo de tiempo en el que el número de microorganismos en un alimento será menor que un determinado valor. Los **probabilísticos** incluyen parámetros de probabilidad de crecimiento, inactivación o aparición de una respuesta microbiana en cierto tiempo (Fakruddin et al., 2012; Skandamis y Jeanson, 2015). Los modelos clásicos en microbiología predictiva son modelos **poblacionales**, pero los **individuales** cada vez son más comunes debido al progreso de técnicas que permiten observaciones a nivel celular (Ferrer et al., 2009). Los modelos se definen como **empíricos o fenomenológicos** si describen o reproducen matemáticamente el comportamiento microbiano, generalmente con ecuaciones

polinomiales de primer o segundo orden (Fakruddin et al. 2012) y, por otro lado, **mecanísticos o teóricos** si existe una interpretación de los mecanismos subyacentes del comportamiento observado, es decir, con una base biológica (Skandamis y Jeanson, 2015). Los modelos predictivos existentes, suelen ser una mezcla de ambos (Ross y McMeekin, 2003). La clasificación de los modelos predictivos más utilizada actualmente es la descrita por Whiting y Buchanan en 1993, donde estos se clasifican en **primarios, secundarios o terciarios** (Figura 5).

4.2 Modelos primarios

Los modelos primarios son aquellos que describen la evolución microbiana en función del tiempo (el crecimiento, supervivencia o inactivación) (Geeraerd et al., 2004). El tamaño poblacional se mide mayoritariamente con Unidades Formadoras de Colonias, UFC (*Colony Forming Units*, CFU), pero también se emplea la biomasa, medidas de absorbancia, así como nivel de sustrato o productos metabólicos producidos (Whiting, 1995; Geeraerd et al., 2004).

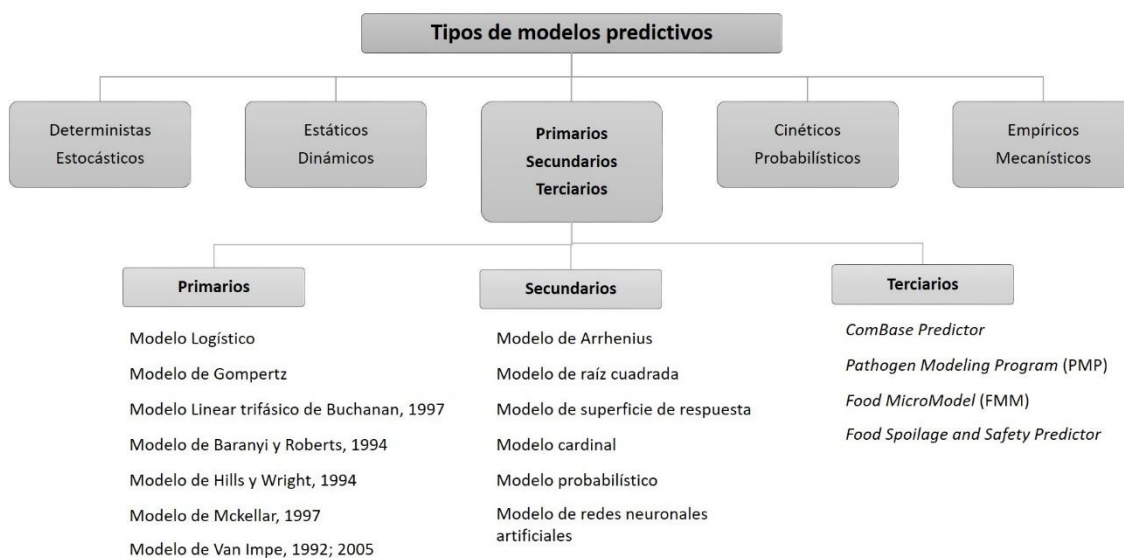


Figura 5. Clasificación de los modelos predictivos así como tipos de los modelos primarios, secundarios y terciarios que se describen en las siguientes secciones.

La mayoría de los modelos primarios describen la evolución de poblaciones microbianas dentro de un ambiente cerrado con condiciones constantes, donde las fuentes son finitas, no renovables y los metabolitos excretados por las células vivas y las células muertas no se eliminan (Peleg y Corradini, 2011). El crecimiento microbiano tiene cuatro fases que pueden modelizar los modelos primarios (Figura 6). Los modelos de muerte o inactivación se utilizan para analizar

la inactivación de microorganismos o sus esporas por tratamientos de conservación, como conservantes (Braun y Sutherland, 2006; Peleg y Corradini, 2011).

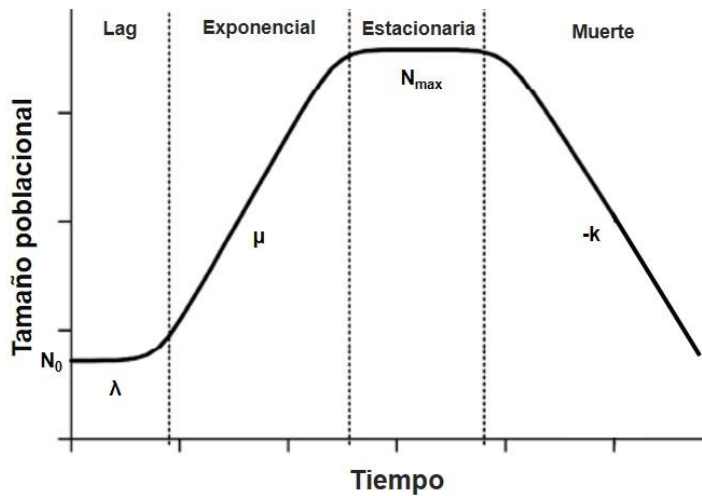


Figura 6. Fases de la curva de crecimiento microbiano en un ambiente cerrado, donde N_0 , es el inóculo inicial de la población, N_{max} , la población máxima que alcanza, λ , el tiempo lag o de latencia, μ , la tasa específica de crecimiento y k , la tasa específica de muerte (Modificación de McKellar y Lu, 2004).

Los parámetros cinéticos que se utilizan en los modelos primarios de crecimiento son λ , μ y N_{max} (Figura 6). El tiempo de latencia, λ , se determina tradicionalmente como la intersección entre las tangentes de las fases lag/latencia y exponencial, pero en muchas ocasiones su determinación es difícil o aparentemente no tienen. La tasa específica de crecimiento, μ (h^{-1}), es el parámetro universal de

crecimiento que se calcula por regresión lineal o como la pendiente de la fase exponencial en el gráfico semilogarítmico. Hay modelos que no tienen en cuenta N_0 y otros en los que no se alcanza N_{max} (definiciones en Figura 6). Ambos parámetros se pueden ajustar como asíntotas del modelo, pero aun así son valores con mucho error si son de varios órdenes de magnitud (Peleg y Corradini, 2011).

Los modelos primarios más utilizados son los modelos que se detallan a continuación.

4.2.1 Modelos sigmoides

Las curvas sigmoides o con forma de "S" son las más comunes para ajustar los datos de crecimiento microbiano en poblaciones limitadas o ambientes cerrados (McKellar y Lu, 2004). Los dos modelos sigmoides más usados han sido el modelo de Gompertz y el modelo Logístico. Ambos forman parte de familia de modelos de Richard y se caracterizan en que la tasa específica o relativa, μ , no es constante (a diferencia del modelo exponencial de crecimiento clásico derivado del modelo de Malthus, Ecuación 1), porque depende de la población que haya en cada momento ($N(t)$) y de la llamada *Carring capacity* o población máxima de células (N_{max}) que el sistema puede soportar (Ecuación 2 y 3). De forma que a medida que la población se va

acercando a ese valor máximo, μ disminuye linealmente en el Logístico (Ecuación 2) y exponencialmente en el de Gompertz (Ecuación 3) (Brown y Rothery, 1994; Mckellar y Lu, 2004). En las curvas sigmoides, μ_{max} se define matemáticamente como la pendiente de la curva semilogarítmica de crecimiento en el punto de inflexión (Peleg y Corradini, 2011).

$$\frac{dN(t)}{d(t)} = \mu N(t) \xrightarrow{\text{integración}} N = N_0 e^{\mu t} \quad \text{Ecuación 1 Exponencial}$$

$$\frac{dN(t)}{d(t)} = \mu N(t) \left(1 - \frac{N(t)}{N_{max}}\right) \quad \text{Ecuación 2 Logístico}$$

$$\frac{dN(t)}{d(t)} = \mu N(t) \text{Ln} \left(\frac{N_{max}}{N(t)}\right) \quad \text{Ecuación 3 Gompertz}$$

El modelo Logístico (Ecuación 4) y el de Gompertz (Ecuación 5) son la solución integral a las Ecuaciones 2 y 3 respectivamente. Pueden estar escritas de diferentes formas con reparametrizaciones diversas (Brown y Rothery, 1994; Mckellar y Lu, 2004), pero la estructura siempre es la misma y está basada en el principio que describen las Ecuaciones 2 y 3.

$$N(t) = \frac{N_{max}}{(1 + A e^{k t})} \quad \text{Ecuación 4 Logístico}$$

$$N(t) = N_{max} e^{-A e^{-k t}} \quad \text{Ecuación 5 Gompertz}$$

En estas versiones, A es el parámetro que depende del ratio entre N_0 y N_{max} y k , la tasa de crecimiento específica en el punto de inflexión o μ_{max} (Brown y Rothery, 1994).

En el modelo Logístico, μ disminuye linealmente con el tamaño de la población (Ecuación 2) y la consecuencia de su integración es la generación de curvas simétricas respecto a su punto de inflexión. En contraste, en el modelo de Gompertz, μ disminuye exponencialmente con el tamaño de la población o linealmente con el logaritmo del tamaño de la población (Ecuación 3) y su integración produce curvas asimétricas, situándose el punto de inflexión un poco antes de la mitad de la curva (Brown y Rothery, 1994).

Los modelos originales de Gompertz y Logístico son modelos parcialmente mecanísticos que se desarrollaron para modelizar tamaños de poblaciones humanas y de animales y también para describir el crecimiento de órganos, tejidos y tumores (Molski y Konarski, 2003). Tiene sentido biológico y se puede admitir como un mecanismo que participe en la determinación del valor de

μ , el que cada vez resulte más difícil para la población crecer en un ambiente en el que progresivamente hay más individuos que compiten por nutrientes más escasos y en el que se van acumulando productos metabólicos potencialmente inhibidores. Sin embargo, no hay ningún dato biológico que permita decidir si esa disminución de μ con el aumento de la población es lineal o exponencial. La opción por uno u otro modelo se basa en la medida de la bondad del ajuste de cada modelo a los datos experimentales y es por tanto puramente

Tabla 7. Algunos ejemplos de la aplicación de la modelización por el modelo Logístico (L), el de Gompertz (G), el lineal trifásico de Buchanan (B) y el modelo de Baranyi y Roberts (B y R).

Modelización	L	G	B	B y R	Referencias
Germinación de esporas de hongos productores de micotoxinas	x	x			Dantigny et al., 2007; Judet et al., 2008; García et al., 2009.
Crecimiento fúngico por contenido en ergosterol o diámetro de las colonias	x	x			Marín et al., 2008; García et al., 2009.
Crecimiento de <i>S. aureus</i> en medios líquidos, placas de agar o alimentos	x	x			Fujikawa y Morozumi, 2006; Ding et al., 2010; Fujikawa, 2010.
Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> spp. en carne de ave de corral			x		Gospavic et al., 2008.
Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en medio a base de carne, con o sin conservantes y en queso	x	x			Pal et al., 2008; Schwartzman et al., 2014.
Cinética de crecimiento de <i>E. Coli</i> y crecimiento de la cepa 0157:H7 en carne de vacuno			x		Fujikawa et al., 2004; Huang, 2010.
Crecimiento de <i>Salmonella</i> en carne picada y en huevo líquido	x	x			Juneja et al., 2009; Sakha y Fujikawa, 2013.
Crecimiento de <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> en verduras de hoja verde			x		Mishra et al., 2016; McKellar y Delaquis, 2011.
Crecimiento bacteriano en diferentes alimentos y medios de cultivo en condiciones isoterma o de temperatura fluctuante				x	Perni et al., 2005; Pal et al., 2008; Panagou y Nychas, 2008; Le Marc et al., 2009; Muñoz-Cuevas, et al., 2010; Lee et al., 2014.
Crecimiento combinado de varias especies bacterianas				x	Puerta-Gómez et al., 2013; Mytilinaios et al., 2015.
Crecimiento de <i>Z. rouxii</i> en zumo bajo diferentes condiciones				x	Rojo et al., 2014.
Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> bajo diferentes condiciones				x	Arroyo-López et al., 2009; Patil et al., 2011

estadística, no basada en un mecanismo biológico identificado. Las versiones modificadas posteriores han tendido precisamente a dar más significado biológico a sus parámetros (Zwietering et al., 1990; McKellar y Lu, 2004).

En la mayoría de los estudios en los que se utilizan estos modelos se suele realizar una comparación estadística de ambos junto con otros modelos. Tanto el modelo logístico como el de Gompertz se han usado ampliamente para modelar el crecimiento de gran variedad de microorganismos, tanto en medios experimentales como directamente en alimentos (Tabla 7).

4.2.2 Modelo lineal trifásico

Teniendo en cuenta las tres primeras fases del crecimiento microbiano: latencia, exponencial y estacionaria (Figura 6), Buchanan et al., en 1997 propusieron un modelo simple y lineal basado en la aproximación de estas fases a tres líneas rectas confluentes entre sí (Figura 7), descritas por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Fase Latencia: Si } t \leq \lambda \quad N_t = N_0 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{Fase Exponencial: Si } \lambda \leq t \leq t_{max} \quad N_t = N_0 + \mu (t - \lambda) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\text{Fase Estacionaria: Si } t \geq t_{max} \quad N_t = N_{max} \quad \text{Ecuación 8}$$

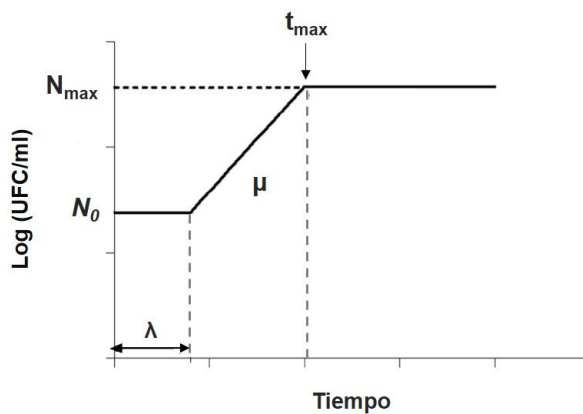


Figura 7. Representación gráfica del modelo lineal trifásico de Buchanan et al., (1997) (Modificación de McKellar y Lu, 2004).

Donde de nuevo N_t es la población a tiempo t , t_{max} el tiempo en el que se alcanza la población máxima (definición del resto de parámetros en Figura 6). En este modelo, μ es nula en las fases de latencia y estacionaria, pero máxima durante toda la fase exponencial.

En varios estudios se destaca, por comparación con otros modelos, la mejor habilidad del modelo trifásico para ajustar los datos experimentales

(López et al., 2004) y la menor variación de los parámetros de crecimiento al modelizar datos obtenidos tanto por métodos de absorbancia como por métodos de recuento en placa (Mytilinaios et al., 2012; Pla et al., 2015). A pesar de la simplicidad y robustez frente a otros modelos cuando los datos experimentales son mínimos (Buchanan et al., 1997), no se aconseja

este modelo para describir y predecir el crecimiento bajo condiciones dinámicas, ya que las transiciones entre las diferentes fases no son tan abruptas (Peleg y Corradini, 2011).

4.2.3 Modelo de Baranyi y Roberts

El modelo de Baranyi y Roberts (1994) es el modelo de crecimiento de referencia más usado para describir el crecimiento sigmoideo microbiano. Su principal diferencia frente a otros modelos sigmoideos, es que la fase exponencial en el gráfico semilogarítmico es casi lineal, sin una curvatura pronunciada. Se trata de un modelo parcialmente mecanístico que abarca todas las fases de crecimiento, incluyendo la fase de latencia que no está específicamente considerada en los modelos Logísticos o de Gompertz. Además, ciertas versiones también modelan la muerte.

Baranyi y Roberts modelizan la fase de latencia asumiendo que la población no arrancará a crecer y reproducirse hasta que todas sus células estén metabólicamente preparadas para ello, para lo cual necesitan que se alcance una concentración crítica de un metabolito intracelular desconocido, q . Para describir este proceso, este modelo incorpora una función de ajuste que describe la acumulación del metabolito $q(t)$ a lo largo del tiempo t :

$$\frac{dN(t)}{dt} = \frac{q(t)}{1 + q(t)} \mu_{max} N(t) \left[1 - \left(\frac{N(t)}{N_{max}} \right)^m \right] \quad \text{Ecuación 9}$$

Una vez alcanzado el nivel crítico, la población arrancaría a crecer acabando la fase de latencia y comenzando la fase exponencial. Esta fase se caracteriza por una tasa específica de crecimiento máxima y constante (μ). En contraste con los modelos Logístico y Gompertz pero de forma similar al modelo trifásico, en el modelo de Baranyi y Roberts las células comienzan a crecer manteniendo una μ constante durante toda la fase exponencial. Esto implica asumir que no hay cambios en el ambiente que pudieran afectar al metabolismo de crecimiento durante el tiempo que dura la fase y, que todas las funciones celulares funcionan a una tasa constante e idéntica, por lo que el crecimiento en esta fase se ha denominado crecimiento exponencial equilibrado (*balanced exponential growth*). La fase exponencial da paso a una fase de desaceleración, con una μ decreciente que acaba en la fase estacionaria donde ya no hay crecimiento y μ se hace cero. Los mecanismos subyacentes que se postulan para explicar la disminución de μ en la fase de desaceleración son los mismos que los se han utilizado en los modelos Logístico y Gompertz, es decir, agotamiento de nutrientes y acumulación de metabolitos inhibidores y, por eso, para describir esta fase, Baranyi y Roberts utilizan la ecuación Logística, con disminución lineal de μ con $N(t)$. La gran diferencia está en que el modelo Logístico

describe una μ decreciente durante toda la fase de crecimiento y, Baranyi y Roberts una μ constante con una fase muy corta decreciente entre la fase exponencial y la estacionaria. La duración de esa fase o brusquedad de transición de fases, depende del parámetro m (Ecuación 9), que puede ser tan pequeña que la transición entre la fase exponencial y la estacionaria sea completamente abrupta, como ocurre en el modelo trifásico.

La integración de la Ecuación 9 genera la siguiente versión explícita del modelo (Baranyi y Roberts, 1994):

$$N(t) = N_0 + \mu_{max} A(t) - \frac{1}{m} \operatorname{Ln} \left(1 + \frac{e^{m \mu_{max} A(t)} - 1}{e^{m(N_{max} - N_0)}} \right) \quad \text{Ecuación 10}$$

Además del modelo básico que describe la evolución temporal microbiana (Ecuación 10), y para introducir en el modelo la influencia del estado fisiológico del inóculo, el modelo incorpora las Ecuaciones 11 o 12, donde $A(t)$ es una función que tiene en cuenta el estado fisiológico de las células del inóculo (Baranyi y Roberts, 1994; Mckellar y Lu, 2004):

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \operatorname{Ln} \left(\frac{e^{-\mu_{max} t} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad \text{Ecuación 11}$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \operatorname{Ln} (e^{-\mu_{max} t} + e^{-\mu_{max} \lambda} - e^{-\mu_{max}(t+\lambda)}) \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde μ_{max} es la tasa de incremento del sustrato limitante, que generalmente se asume que es igual a la tasa específica de crecimiento máxima; q_0 una medida del estado fisiológico inicial de las células y λ el tiempo de fase de latencia.

El modelo de Baranyi y Roberts, se ha usado y se usa ampliamente como modelo microbiano de referencia gracias a una serie de razones. En primer lugar, es fácil de utilizar, gracias sobre todo a la facilidad del uso de la aplicación web Combase DMFit, por medio de la cual muchos estudios calculan directamente los parámetros de crecimiento de sus datos experimentales (Matagaras et al., 2011). Además, este modelo se puede aplicar bajo condiciones ambientales dinámicas, tiene buena capacidad de ajuste y la mayoría de los parámetros que emplea tienen significado biológico (Mckellar y Lu, 2004; Van Impe et al., 2005). A pesar de esto, se han propuesto modificaciones para completar este modelo que incluyan la eliminación de nutrientes y el efecto de los productos metabólicos de desecho (Van Impe et al., 2005).

La versatilidad de este modelo hace que, en la mayoría de los estudios de modelización del crecimiento microbiano, el modelo de Baranyi y Roberts siempre esté incluido en el análisis comparativo con otros modelos, siendo en la mayoría de los casos, el que mejor se ajusta a los

datos experimentales. En el caso de hongos, es el segundo modelo más utilizado, después del modelo lineal clásico, para modelizar el crecimiento del diámetro de sus colonias (García et al., 2009). En bacterias y levaduras, existen infinitos ejemplos de su aplicación (algunos en Tabla 7).

4.2.4 Otros

Existen otros modelos primarios que, aunque son utilizados en menor proporción que los anteriores, también requieren su mención. En primer lugar, aunque hay pocas referencias a su uso, el modelo de Hills y Wright de 1994 que se basa en el concepto de la síntesis, división celular y biomasa celular y está formado por dos funciones, una de ellas una función biexponencial de Gompertz (Wright et al., 2000; Benedito et al., 2011). Mckellar en 1997 propuso un modelo empírico logístico basado en la existencia de dos estados poblacionales distintos, las células microbianas que crecen y las que no crecen, útil sobre todo para simular el comportamiento de células individuales en ambientes cambiantes. Debido a su similitud y simplicidad frente al modelo de Baranyi, este modelo no se ha utilizado extensamente (Mckellar y Lu, 2004). Van Impe et al., en 1992 desarrollaron un modelo dinámico con ecuaciones diferenciales que predice el crecimiento y la inactivación como una función del tiempo y temperatura. Más recientemente estos autores proponen otro modelo con términos de concentración de sustrato y productos tóxicos de desecho, ya que reiteran que la entrada de la población en fase estacionaria depende de la disminución del primero y el aumento del segundo (Van Impe et al., 2005).

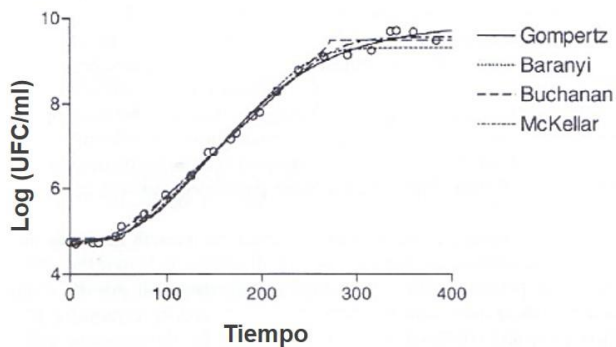


Figura 8. Comparación del crecimiento de *L. monocytogenes* usando cuatro de los modelos primarios descritos (Modificación de Mckellar y Lu, 2004).

Una de las conclusiones a destacar de esta revisión de modelos primarios es que, pesar de las notables diferencias en las premisas e hipótesis subyacentes a cada uno de los modelos, cuando se aplican a casos concretos producen curvas que se suelen adaptar bien a los datos experimentales, tanto visualmente como por la medida de la bondad de los respectivos ajustes,

aunque haya diferencias significativas (Figura 8). En la mayoría de los estudios se suelen comparar varios modelos y en base a las medidas del ajuste de cada uno, se selecciona cuál es el más simple y adecuado para su estudio (Buchanan et al., 1997; Peleg y Corradini, 2011). Una excepción la constituye el modelo de Baranyi y Roberts que ha sido el único utilizado para

realizar los modelos secundarios y terciarios contenidos en la base de datos ComBase, como hemos citado anteriormente.

4.3 Modelos secundarios y terciarios

Los modelos secundarios son aquellos que describen la evolución de uno o más parámetros de los modelos primarios en función de factores ambientales tales como, en el caso de alimentos, los factores intrínsecos (pH, actividad de agua, concentración de sales o conservantes, etc.) o los factores extrínsecos del mismo (temperatura, humedad relativa, atmósfera, etc.) (Ross y Dalgaard, 2004) o una combinación de varias variables ambientales. Existen diferentes tipos de modelos secundarios (Figura 5). De acuerdo con Geeraerd et al., (2004), tanto los modelos de raíz cuadrada como los cardinales son modelos secundarios con interpretación biológica de sus parámetros, siempre con buen ajuste y se pueden extender hacia más factores ambientales por un efecto combinado multiplicativo debido a la actividad independiente de los factores (Zwietering et al., 1992; Ross y Dalgaard, 2004). Los modelos polinomiales, también llamados de superficie de respuesta, son los modelos más comunes en microbiología predictiva y se emplean cuando se estudian varios factores ambientales a la vez. Estos se construyen con regresión lineal múltiple y permiten ver las interacciones de todos los factores entre sí (García et al., 2009).

Los modelos terciarios se generan a partir de la integración de los modelos primarios y secundarios en base de datos de programas informáticos que funcionan como herramientas. El usuario de estas aplicaciones informáticas, no necesita conocer en profundidad los modelos matemáticos primarios y secundarios adyacentes, lo que hace que sean herramientas simples y muy útiles para el sector de la industria alimentaria o investigadores.

Actualmente, en internet existen varias páginas y software de microbiología predictiva para modelizar la evolución de microorganismos deteriorantes o patógenos transmitidos por alimentos. En el artículo de Tenenhaus-Aziza y Ellouze del 2015, se detallan hasta 16 softwares de microbiología predictiva y evaluación de riesgos, presentados en la octava Conferencia Internacional sobre Modelización predictiva de la Alimentación del 2013. El más conocido es el *ComBase Predictor* (www.combase.cc), una base de datos con más de 50000 grabaciones de un total de 15 microorganismos, para describir el crecimiento o inactivación de éstos en medios o alimentos bajo diferentes factores clave del ambiente de los alimentos. Ha sido desarrollado por el *Food Standards Agency* y el *Institute of Food Research* de Reino Unido, en colaboración con el *USDA Agricultural Research Service* y el *Eastern Regional Research Center* de Estados Unidos, incorporando datos del *Pathogen Modeling Program* (PMP) y del *Food MicroModel* (FMM)

(Baranyi y Tamplin, 2004; Braun y Sutherland, 2006; Tenenhaus-Aziza y Ellouze, 2015). En esta página también se incluye el acceso al programa DMFit, el cual permite modelizar datos siguiendo diferentes modelos de crecimiento: el modelo de Baranyi y Roberts de 1994 o los modelos trilinear, bifásico o linear. El *Food Spoilage and Safety Predictor* (<http://fssp.food.dtu.dk>) es la versión más reciente de otro software que contiene modelos para predecir el crecimiento y la vida media de bacterias patógenas y deteriorantes en productos cárnicos y de mar, desarrollado por el *National Food Institute, DTU Food* de Dinamarca (Dalgaard et al., 2002; Tenenhaus-Aziza y Ellouze, 2015).

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todo lo expuesto en la sección de introducción y la multidisciplinalidad requerida, esta Tesis se encuadra en tres objetivos principales abordados a través de sus respectivos objetivos parciales:

Capítulo 1: Modelización del crecimiento superficial de levaduras sobre medios sólidos y su aplicación al efecto inhibitor del sorbato potásico

- Desarrollo y evaluación de un algoritmo de análisis de imagen para la medida del crecimiento en tamaño de las colonias.
- Elaboración de un modelo matemático que describa el crecimiento de colonias de levaduras sobre superficies sólidas en tiempos largos, comparación con los ya existentes y establecimiento de relaciones entre parámetros de medida.
- Aplicación de las herramientas y modelos desarrollados sobre el crecimiento de levaduras en medio sólido con sorbato potásico.

Capítulo 2: Análisis molecular de la producción de 1,3-pentadieno en las levaduras *D. hansenii* y *Z. rouxii*.

- Estudio de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de *Z. rouxii* y *D. hansenii*.
- Búsqueda *in silico* de secuencias homólogas del gen *PAD1* y *FDC1* de *S. cerevisiae* en *D. hansenii* y *Z. rouxii*, secuenciación y comparación en diferentes cepas de estas especies.
- Comparación de la proteína Pad1p y Fdc1p de diferentes especies microbianas.
- Desarrollo de un método de PCR para la discriminación de cepas productoras de 1,3-pentadieno.

Capítulo 3: Utilización de un detector basado en espectroscopía de infrarrojo medio (MWIR) para detectar gases responsables del deterioro por levaduras de alimentos.

- Detección de 1,3-pentadieno puro y producido en el espacio de cabeza de cultivos de levaduras (aplicaciones de temperatura ambiente) por medio de un detector no refrigerado MWIR. Identificación y comparación de bandas de interés.
- Análisis multivariante de los espectros por técnicas supervisadas y no supervisadas en busca de un patrón diferencial de cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno.

CAPÍTULO 1

Modelización del crecimiento superficial de levaduras sobre medios sólidos y su aplicación al efecto inhibidor del sorbato potásico

INTRODUCCIÓN

Cada vez son más los estudios que demuestran que no es fiable extrapolar directamente los datos obtenidos con el crecimiento de los microorganismos en medio líquido a alimentos o medios sólidos sin tener en cuenta las diferencias en el tipo de crecimiento. Para ello, vamos a analizar en primer lugar las características de los alimentos sólidos que influyen en el crecimiento microbiano, los modelos existentes sobre el crecimiento superficial y las técnicas de estudio empleadas para el seguimiento del crecimiento microbiano en medio sólido, especialmente las técnicas de análisis de imagen. Un primer objetivo del presente capítulo es el desarrollo de metodologías sencillas y fiables mediante técnicas clásicas y de análisis de imagen para evaluar cuantitativamente el crecimiento de poblaciones de levaduras sobre soportes sólidos. Esta metodología permitiría obtener los datos para construir modelos matemáticos predictivos fiables, ya que la calidad de un modelo depende sobre todo de los datos empíricos en los que se basa. Finalmente analizaremos la aplicación del modelo desarrollado al caso concreto de la acción del sorbato como conservante en medios/alimentos sólidos durante el crecimiento de levaduras en ellos.

1. Modelización y crecimiento microbiano sobre estructuras sólidas

1.1 Estructura del alimento y su influencia en el crecimiento microbiano

La supervivencia y crecimiento de los microorganismos en alimentos no solo depende de la composición y las condiciones de almacenamiento de los mismos, sino que también existe otro factor intrínseco del alimento por el cual se ve afectado, su estructura física o microestructura (Wilson et al., 2002; Deák, 2008). En los alimentos líquidos, los microorganismos crecen de forma plantónica y, alguno de ellos, gracias a su motilidad y a fenómenos de taxis, pueden desplazarse hacia ciertas zonas más ricas en nutrientes. El transporte de nutrientes hacia las células microbianas y de metabolitos fuera de ellos, contribuye a la formación de un ambiente temporal homogéneo o uniforme hasta que se producen cambios debido al agotamiento de los nutrientes o hasta que los metabolitos microbianos se acumulan a niveles tóxicos (Wilson et al., 2002; Skandamis y Jeanson, 2015).

La microestructura de un alimento está determinada en primer lugar por la fase no acuosa, dependiente de la distribución y tamaño de las partículas de aceite, así como del tamaño de los

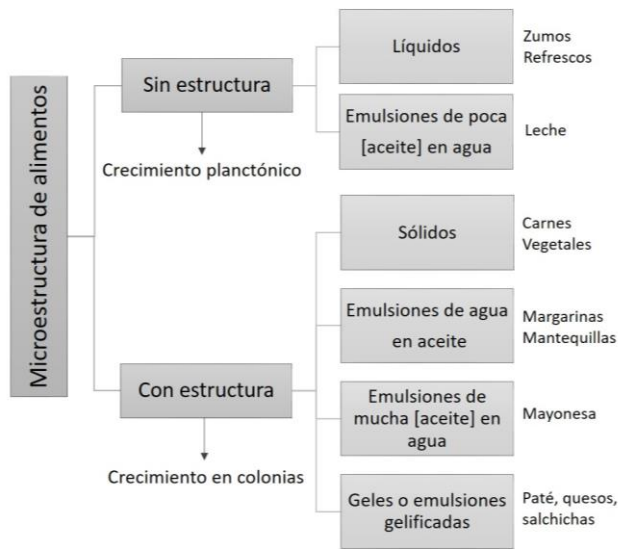


Figura 1. Tipos de alimentos en función de su estructura y ejemplos.

poros de la matriz cuando hay agentes gelificantes o proteínas y, en segundo lugar, por la fase acuosa disponible (Skandamis y Jeanson, 2015). En función de la microestructura, los alimentos sólidos se clasifican en diferentes grupos (Figura 1) (Wilson et al., 2002; Aguilera, 2005). Además, la microestructura de los mismos, al igual que su composición, puede ser uniforme o constar de regiones diferentes (Dens y Van Impe, 2001). Por tanto, el crecimiento de los microorganismos va a depender de la

composición y la estructura de la localización donde se hallen dentro de los alimentos (Malakar et al., 2003). En aquellos con cierta microestructura (Figura 1), las células microbianas están inmovilizadas y limitadas a crecer formando colonias en la superficie, o incluso sumergidas como en el caso de los geles, o entre las gotas de aceite en emulsiones de agua en aceite (Brocklehurst et al., 1995a; Wilson et al., 2002; Theys et al., 2008; Aspridou et al., 2014).

A diferencia de los líquidos, en los alimentos o medios sólidos, el hecho intrínseco de tener cierta estructura lleva implícito limitaciones físicas que impiden la movilidad de los microorganismos y limitaciones en la distribución de compuestos, acumulación de metabolitos y aparición de gradientes alrededor de las colonias. Todo esto hace que en la mayoría de los casos los microorganismos crezcan de forma más lenta que en líquido (Wilson et al., 2002; Skandamis y Jeanson, 2015). La difusión molecular jugará un papel muy importante en el transporte de sustratos hacia las células de la colonia y productos de desecho desde ellas (Malakar et al., 2003).

Entre las limitaciones de distribución de compuestos o limitaciones por difusión destacan los compuestos gaseosos, la distribución de nutrientes y agua. En cuanto al oxígeno, existen diversos estudios donde se analiza la capacidad de penetración del oxígeno dentro de las colonias (Fraleigh y Bungay, 1986; Peters et al., 1987; Walker et al., 1997) y, aunque este está disponible totalmente para las primeras capas de células ya que penetra tanto por el aire como por los intersticios del medio, a medida que aumenta el tamaño de colonias, existirán zonas anóxicas o con una menor difusión gaseosa (Kamath y Bungay, 1988; Pipe y Grimson 2008). En

cuanto a la difusión de los nutrientes hacia las células, del mismo modo que para el O₂, a medida que aumenta el número de capas celulares en la colonia, habrá más limitaciones para su acceso (Pirt, 1967; Reyrolle y Letellier, 1979; Kamath y Bungay, 1988; Malakar et al., 2002, 2003; Su et al., 2012). Existen numerosos estudios donde se demuestra que las células de la periferia de las colonias tienen un mejor acceso a los nutrientes y otros compuestos que las células del interior (McKay et al., 1997; Traven et al., 2012; Jeanson et al., 2015). En otros se demuestra además que las células del centro sufren de una apoptosis selectiva cuyos componentes celulares liberados pueden servir de nutrientes para las células de la periferia (Čáp et al., 2009; Váchová y Palková 2011; Váchová et al., 2012). La difusión tanto de los nutrientes como del agua hacia las células de las colonias va a depender de la porosidad de la matriz, gel o emulsión (Stecchini et al., 2000; Aspridou et al., 2014; Jeanson et al., 2015; Skandamis y Jeanson, 2015). El crecimiento colonial también afectará a la distribución de ácidos orgánicos, conservantes y otros compuestos presentes en los alimentos (Wilson et al., 2002).

Con el crecimiento microbiano en forma de colonias, los productos de desecho, así como otros compuestos producidos por su actividad metabólica, son liberados al exterior de las células acumulándose y generando gradientes dentro y fuera de éstas (Wilson et al., 2002; Pipe y Grimson, 2008; Jeanson et al., 2015), como los gradientes de pH debido a ciertos ácidos liberados que se observan en algunos estudios con bacterias (Walker et al., 1997; Malakar et al., 2000; Jeanson et al., 2015).

Todas estas características en medios y alimentos sólidos hacen que se genere un ambiente más espacialmente heterogéneo y estresante para el crecimiento microbiano (Skandamis y Jeanson, 2015).

1.2 Modelos de crecimiento en medio sólido

La mayoría de los modelos predictivos se construyen a partir de datos obtenidos en medios de cultivo homogéneos, principalmente caldos, bajo un limitado número de factores controlados. Sin embargo, cuando se trata de extrapolar y validar estos modelos en alimentos reales aparecen muchas discrepancias debido a los numerosos factores a los que está sometido el crecimiento de los microorganismos en ellos, como la presencia de antimicrobianos naturales, la propia microflora, la estructura del alimento, etc. (Kilcast y Subramaniam, 2000). Precisamente, una de las principales fuentes de error en microbiología predictiva está originada por el hecho de despreciar en la realización del modelo la heterogeneidad y estructura propia

de los alimentos sólidos junto a todo lo que ello conlleva (apartado anterior) (McMeekin y Ross, 2002). Esto genera resultados denominados como “falsos-seguros” o “falsos peligrosos”, en función de si el microorganismo crece en el alimento sólido de forma más lenta o más rápida respectivamente (Wilson et al., 2002; Brockelehurst, 2004). Precisamente en los estudios de Koutsoumanis et al., (2004) y Theys et al., (2008 y 2010) concluyen que, los límites de crecimiento, al igual que la tasa específica de crecimiento de las bacterias que estudian, son claramente más pequeños en medios sólidos que líquidos. Por tanto, sería un completo error utilizar los modelos generados en medio líquido para predecir con exactitud, la calidad y seguridad de los productos alimenticios sólidos (Aspridou et al., 2014). Tanto es así, que Dens y Vam Impe, (2001) proponen considerar siempre la estructura y el espacio como variables independientes en modelos predictivos de alimentos estructurados.

Debido al gran coste que supone, existen pocos trabajos donde se estudie el crecimiento de los microorganismos directamente en alimentos sólidos. Algunos ejemplos son en la superficie de carnes como salchichas, rodajas de carnes, chorizo, pan, quesos o alimentos vegetales (Mattila y Frost, 1988; Katsaras y Leistner, 1991; Abellana et al., 1999; Wilson et al., 2002; Mataragas et al., 2006; Noriega et al., 2010). Para mimetizar las condiciones y estructura de alimentos sólidos, los investigadores emplean agar o gelatina en su mayoría como agentes gelificantes y, para cubrir un amplio rango de modelos de alimentos, también hay algunos autores que emplean otros agentes como goma de xantano, carbopol, carragenina (Lobete et al., 2015) o Maxiren 180, un agente coagulante para realizar un modelo de queso (Jeanson et al., 2011). Los dispositivos que se suelen emplear para mantener la estructura sólida son placas de Petri, tubos cilíndricos o cónicos (Vulin et al., 2014; Lobete et al., 2015) o cassettes de gel (Brocklehurst et al., 1995b), donde se estudia el crecimiento de las células microbianas de las colonias que crecen sobre su superficie, de aquellas que crecen embebidas en su interior, o de ambas.

Las colonias microbianas son estructuras formadas por billones de células que interaccionan de forma compleja y que se encuentran organizadas en capas (Gómez-Aguado, et al., 2011). Se originan a partir de divisiones de la(s) primera(s) célula(s) inmovilizada(s) y se expanden progresivamente siguiendo un patrón concéntrico. Las células permanecen agregadas gracias a la protección que les proporciona la estructura, facilitada además, por la heterogeneidad genética y fenotípica que puede aparecer en ellas (Pipe y Grimson, 2008; Váchová et al., 2012). Tradicionalmente, las colonias microbianas se han estudiado con el fin de analizar la diversidad morfológica en la identificación de especies microbianas. Sin embargo, en las últimas cinco décadas, los científicos han mostrado más interés en el desarrollo cuantitativo, más que

meramente descriptivo, desarrollándose modelos de formación y crecimiento de colonias, principalmente en bacterias y hongos filamentosos y escasos en levaduras (Pipe y Grimson, 2008).

En los primeros modelos cuantitativos del crecimiento de colonias, se analizó la influencia relativa de parámetros como la concentración de nutrientes o disponibilidad de oxígeno sobre el crecimiento en superficie y altura de las colonias (Pirt, 1967; Fraleigh y Bungay, 1986; Kamath y Bungay, 1988). Probablemente el primer modelo fue el descrito por Pirt en 1967 al analizar el

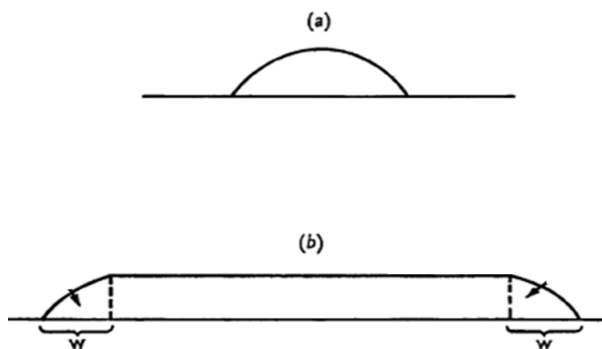


Figura 2. Secciones del modelo de crecimiento de las colonias (Pirt, 1967). **a)** Crecimiento de la colonia durante la fase exponencial. **b)** Crecimiento limitado a la zona periférica de la colonia, de ancho w . La fórmula es la que rige la fase de crecimiento lineal del radio de la colonia.

crecimiento de colonias de *E. coli* sobre placas de agar. En él se asume que inicialmente hay una fase de crecimiento exponencial de todas las células de la colonia donde toda la población contribuye al crecimiento global de ésta en todas las direcciones (Figura 2a). Esta fase ocurre cuando la colonia no es todavía visible para el ojo humano (Palumbo et al., 1971), fase también detectada por otros autores (Rodin y

Panikov, 1995; Mitchell y Wimpenny, 1997; Meunier y Choder, 1999; Kabanova et al., 2012). Según va aumentando el tamaño de la colonia, aumentaría la demanda y consumo de nutrientes dentro de la misma, de forma que comenzaría a generarse un gradiente de concentración de los nutrientes bajo éstas, provocando el inicio de la denominada “Ley de crecimiento lineal”. En esta fase, Pirt asume, aunque no lo demuestra, que es debido a la muerte de las células del interior de la colonia, quedando el crecimiento restringido a un anillo de células de la periferia, de ancho w , en donde se asume que los nutrientes y el oxígeno aun llegan bien a las células (Figura 2b) (Pirt, 1967, Pirt, 1975). La anchura del anillo de crecimiento se propone que es constante debido a un balance entre fuerzas (fuerza de expansión de bacterias en división y fuerza no covalente entre la descendencia bacteriana y las bacterias y el sustrato) una vez que las colonias han alcanzado cierta edad (Su et al., 2012). En esta fase, el radio de la colonia crece linealmente con el tiempo a una tasa máxima y constante, Kr , (Pirt, 1975):

$$\text{“Ley de crecimiento lineal”} \quad \left\{ \begin{array}{l} r = Kr \cdot t + r_0 \\ Kr = \mu \cdot w \end{array} \right.$$

Esta fase de crecimiento lineal del radio, según Palumbo et al., (1971), sería la equivalente a la fase exponencial de crecimiento en medio líquido, al igual que Kr con μ . Muchos estudios han observado crecimiento lineal del radio de colonias tanto en bacterias como en levaduras creciendo con diferentes fuentes de carbono y concentraciones de agar y/o han empleado esta ecuación para describirlo (Gray y Kirwan, 1974; Grimson y Barker, 1993; Rodin y Panikov, 1995; Wimpenny et al., 1995a; Mitchell y Wimpenny, 1997; Harrison et al., 2000; Salvesen y Vadstein, 2000; Stecchini et al., 2000; Komoto et al., 2003; Melzoch et al., 2004; Váchová y Palková, 2005; Nithyaja et al., 2009; Krulikovská et al., 2011; Walther et al., 2011; Mertens et al., 2012; Harcombe et al., 2014).

Un año más tarde Cooper et al., (1968) determinaron una tercera fase en el crecimiento de las

$$\text{“Ley de crecimiento del área”} \left\{ \begin{array}{l} r^2 = Ka \cdot t + r_0^2 \\ Ka = 2 \cdot \mu \cdot b \end{array} \right.$$

colonias cuando estudiaban colonias de *Klebsiella aerogenes*. La denominaron “Ley de crecimiento del área” caracterizada por una desaceleración del crecimiento del radio porque comienza a aumentar linealmente con el tiempo el cuadrado del radio de la colonia a una tasa constante, Ka . Gray y Kirwan en 1974, en sus estudios con colonias de *S. cerevisiae* proponen que la transición entre las dos últimas fases de crecimiento de la colonia se produce por la limitación de algún nutriente del medio porque aparece más tardíamente cuando hay más concentración de nutrientes.

Con respecto a la altura de la colonia, Pirt, (1967, 1975) estableció que la concentración de los nutrientes es la que fija su altura máxima, constante en colonias maduras a excepción de la zona periférica. Hasta llegar a su altura máxima, plana o abovedada (Wimpenny, 1979), la altura según diversos estudios, parece ser que va aumentando linealmente con el tiempo a velocidad constante (Palumbo et al., 1971; Kamath y Bungay, 1988; Grimson y Barker, 1993; Pipe y Grimson, 2008; Vulin et al., 2014) aunque con un orden de magnitud menor que el crecimiento del radio (Grimson y Barker, 1993). Kamath y Bungay en 1988, aprovechando el lento aumento de la altura de las colonias y asumiendo un perfil de estas hemisférico, establecieron un modelo de crecimiento de colonias en tres dimensiones con *Candida utilis*. En este modelo se marcan cuatro fases (Figura 3) en función de la altura de las colonias y la difusión de glucosa y oxígeno dentro de las mismas. Cada una de estas fases contiene ecuaciones referentes al radio y al volumen de las colonias. Proponen que tras una fase de crecimiento exponencial, las deficiencias de oxígeno que afectan a las células de la parte inferior de la colonia y las deficiencias de

nutrientes que afectan a las células de la parte superior harían que el crecimiento solo continuara en una estrecha banda central donde todavía coinciden el oxígeno y la glucosa para las células. Después, la colonia seguiría creciendo en altura hasta que o bien las células son

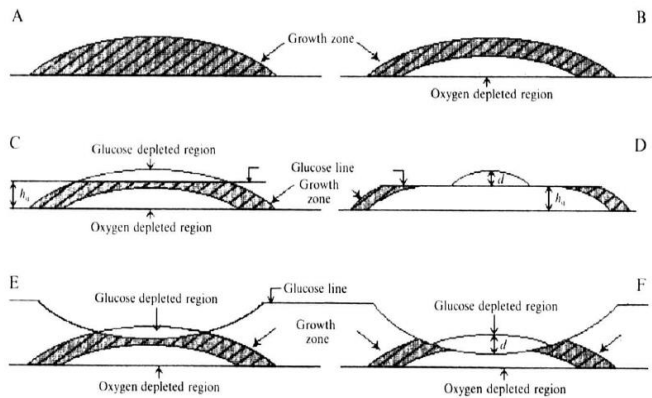


Figura 3. Esquematización de las distintas fases del crecimiento de la colonia según Kamath y Bungay, (1988). Las zonas grises indican las zonas de crecimiento de las colonias.

privadas de oxígeno, o bien privadas de nutrientes, lo que implicaría la detención del crecimiento vertical, continuando únicamente en la periferia de la colonia. Tanto el modelo de Pirt (1967, 1975) como el de Kamath y Bungay (1988) refuerzan que el crecimiento de la colonia después de la fase exponencial invisible, es debido a las células de su periferia. Esta afirmación es rechazada por algunos estudios que señalan que existen células dividiéndose activamente en cualquier posición de la colonia o que sugieren que tanto las células del centro como del borde contribuyen al crecimiento de la misma (Reyrolle y Letellier, 1979; Panikov et al., 2002; Su et al., 2012). Sin embargo, estudios posteriores más moleculares, han permitido concluir que la mayoría de las células en crecimiento se deben concentrar en la periferia de la colonia. Uno de ellos es el estudio de Meunier y Choder de 1999, donde encontraron expresión diferencial del gen *SSA3*, marcador de fase estacionaria, en las células del centro de las colonias, y el gen *ACT1*, marcador de células en división, en las células de la periferia. Otros son los estudios del grupo de Palková y Váchová, recopilados en las revisiones de Váchová y Palková, (2011) y Váchová et al., (2012), en los que se señala también la presencia mayoritaria de células en crecimiento y división en el borde, y células estacionarias y muertas en el centro. Además, por técnicas de análisis de imagen se observa que la tasa específica de crecimiento no es constante en las colonias de *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*, siendo máxima en las células de la periferia y disminuyendo hasta 0 en las células del centro (Wimpenny et al., 1995b; McKay et al., 1997).

Melzoch et al., en 2004 realizaron un modelo basado en una modificación del modelo de Pirt pero teniendo en cuenta el factor de la rugosidad del borde de las colonias, cuando estas no eran círculos perfectos. Pipe y Grimson (2008) establecieron un modelo simple para describir la dinámica de las colonias de *Serratia marcescens* y *E. coli*. Consistía en representar el logaritmo

natural de la altura o diámetro de la colonia frente al logaritmo neperiano del tiempo. La relación de esos parámetros era lineal a excepción de la desviación que se observa en los primeros y últimos días de crecimiento. En los últimos días de crecimiento la relación es cero, estableciéndose una fase “plateau” que según los autores marca el inicio de una deficiencia de todos o algún nutriente específico.

Recientemente, utilizando un método que restringe el crecimiento de colonias de levaduras a una forma de cilindro, se ha averiguado en *S. cerevisiae* que estas colonias crecen a una tasa de crecimiento vertical (en altura) constante durante varios días, en un estado formado por células quiescentes en el borde superior y varias capas de células replicativas en la base junto al sustrato. Esta tasa es inversamente proporcional al radio del cilindro de las colonias y, en vez de depender de la tasa de división celular, está directamente relacionada con el rendimiento metabólico de la colonia (Vulin et al., 2014).

Theys et al., (2009) desarrollaron un modelo cuantitativo para describir la dinámica de crecimiento de las colonias sumergidas de *Salmonella typhimurium* en gelatina, respecto a la cantidad de células vivas y muertas y al volumen colonial. Para su desarrollo parten de tres premisas básicas: en fase exponencial solo hay células vivas y no ocurre muerte celular; en fase estacionaria el número de células vivas permanece constante en un anillo exterior de la colonia de volumen también constante, y por último, que la densidad celular en fase estacionaria es constante. Este modelo introduce varias tasas específicas de crecimiento: la tasa específica de crecimiento máxima de células vivas, la tasa específica de crecimiento máxima del volumen colonial en fase exponencial y la de la fase estacionaria. Este estudio supone la primera vez que se investiga de forma cuantitativa la evolución de células vivas y muertas en la que denominan la fase estacionaria de crecimiento de las colonias.

En el caso de hongos filamentosos, el modelo más extensamente utilizado para modelizar su crecimiento es el modelo lineal de crecimiento del diámetro, el cual, a diferencia de bacterias y levaduras, podría ser indefinido de no ser por el alcance del borde de la placa (Pirt, 1975). El modelo lineal y el bifásico de Baranyi y Roberts (fase lag y exponencial) se utilizan cuando en el crecimiento no se observa una tendencia asintótica; pero cuando se observa un decremento en la tasa específica de crecimiento con el tiempo, se obtienen mejores ajustes con el modelo completo de Baranyi y Roberts o el sigmoide de Gompertz (Marín et al., 2008).

En bacterias, además del radio o el diámetro, también algunos estudios han utilizado el área de las colonias como medida del crecimiento. En colonias sumergidas en gel-cassetes, Skandamis

et al., (2007) obtuvo buenos valores de ajuste con el modelo de Baranyi y Roberts aplicado al logaritmo del área de las colonias frente al tiempo. De esta forma se pudo obtener el valor de μ_{max} del crecimiento del área de las mismas. En otro estudio se detectó un aumento lineal del área hasta las 24 h de medición, en colonias de *E. coli* creciendo también en microplacas (Mertens et al., 2012) y Nithyaja et al., (2009) encontró, hasta el cese del crecimiento de colonias gram positivas, un aumento exponencial del área. En colonias de *S. cerevisiae* creciendo en medios con glicerol como fuente de carbono, el aumento del área de las colonias fue de forma lineal durante más de 15 días (Váchová y Palková, 2005; Palková et al., 2009).

Tabla 1. Ejemplos de relaciones existentes entre diferentes parámetros de las colonias.

Especie	Tipo de relación	Ajuste	Bibliografía
<i>L. monocytogenes</i>	Correlación lineal $\text{Log (UFC/col)} = 1,229 \cdot \text{Log (Área/col)} + 4,451$	$R^2 = 0,986$	Guillier et al., 2006
<i>E. coli</i> (colonias sumergidas)	Correlación lineal entre Log (UFC/g) y Log (Área/col). La pendiente varía según las condiciones de pH y temperatura	ND	Skandamis et al., 2007
	Correlación lineal $\mu_{max} = 1,5654 \cdot \text{Área} (\mu_{max}) - 0,0549$ Área (μ_{max}) obtenido por el ajuste del aumento del área por el modelo de Baranyi y Roberts	$R^2 = 0,986$	
<i>L. monocytogenes</i> (<i>L. m.</i>) y <i>Y. enterocolitica</i> (<i>Y. e.</i>)	Correlación lineal entre Log (UFC/g) y Log (Radio/col)	$R^2 = 0,980$ (<i>L. m.</i>) $R^2 = 0,990$ (<i>Y. e.</i>)	Harrison et al., 2000
<i>S. typhimurium</i>	Correlación lineal entre UFC/colonia y Radio/col Radio <1mm (hasta 30h de crecimiento)	ND	McKay y Peters, 1995
	Correlación lineal (fase exponencial) Colonias sumergidas $\mu_{max} (\text{Vol}) = 0,6245 \cdot \mu_{max} (\text{UFC}) + 0,0033$ Para todas las combinaciones de pH y Aw analizadas	$R^2 > 0,750$	Theys et al., 2009

Col: Colonia; Vol: Volumen; UFC: Unidades Formadoras de Colonias; ND: No Determinado

Muchos autores, en vez de establecer un modelo en sí, han tratado de buscar relaciones entre diferentes parámetros de medida de crecimiento de las colonias (Tabla 1). La mayoría son relaciones encontradas bajo condiciones determinadas durante el crecimiento de colonias bacterianas y que podrían utilizarse como una herramienta en control de calidad de alimentos y medios, ya que, al medir un parámetro fácilmente observable, permiten obtener indirectamente y de forma más rápida otro parámetro que tarda tiempo en obtenerse, como es el número de células viables o densidades de población (Chapuis et al., 1995; Skandamis et al., 2007).

2. Técnicas de estudio de crecimiento de colonias en medio sólido

Actualmente existen diferentes enfoques para estudiar el crecimiento colonial en sistemas sólidos. Las técnicas más tradicionales son las técnicas invasivas, las cuales han ayudado a incrementar el conocimiento del comportamiento colonial, pero debido a su carácter invasivo y el consecuente desecho de la muestra, su utilización conlleva a la pérdida de información individual. Entre estas técnicas, la más utilizada es la de recuento de viables en placa. Se utiliza normalmente en combinación con otras técnicas más modernas (Lobete et al., 2015) y es la más utilizada para elaborar curvas de calibración con variables procedentes de métodos de recuento indirecto (Skandamis et al., 2007). Sin embargo, es una técnica laboriosa y duradera hasta obtener los resultados. En la mayoría de los estudios donde se desarrollan modelos de crecimiento en medios o alimentos tanto sólidos como líquidos, se toma la muestra completa inoculada o una porción para estudiar toda la población microbiológica presente en ella (Theys et al., 2008, 2009; Ding et al., 2010). Pero el comportamiento heterogéneo de las células de la colonia está conduciendo a que muchas investigaciones traten de estudiar individualmente las colonias y sus células en vez de toda la población microbiana presente en la muestra sólida o en el alimento (Lobete et al., 2015). Técnicas invasivas como la turbidimetría y la biomasa o peso seco, muy empleadas en cultivos líquidos, han sido muy poco utilizadas como técnica de análisis de crecimiento microbiano en medio sólido (Palková et al., 2009).

Una de las técnicas invasivas que más ha ayudado a entender el microambiente de las colonias respecto a la penetración de oxígeno en las mismas y los gradientes de pH y metabolitos dentro y fuera de ellas, ha sido gracias a la utilización de microelectrodos, (Wimpenny y Coombs, 1983; Peters et al., 1987; Kamath y Bungay, 1988; Wimpenny et al., 1995a; Walker et al., 1997). Para ver esos gradientes también se emplean técnicas de fluorescencia o MALDI-TOF acoplado a espectrometría de masas (Malakar et al., 2000; González et al., 2012).

El uso de fluoróforos en combinación con microscopía laser confocal ha permitido obtener una mejor resolución al reconstruir la imagen colonial en 2 o 3D (Lobete et al., 2015). Diversos estudios han utilizado la microscopía de fluorescencia o esta combinación para el análisis de la distribución celular de las colonias por medio de proteínas de interés marcadas con GFP o mediante el uso de colorantes vitales, como en colonias de *Lactococcus lactis* en modelos de queso y en colonias de *S. cerevisiae* (Jeanson et al., 2011; Váchová et al., 2011) o con dextrano

o gelatina marcado con Rodamina B para estudiar la porosidad colonial y el efecto de la microestructura en colonias (Nithyaja et al., 2009; Boons et al., 2013; Floury et al., 2013).

Las últimas tendencias en el estudio del crecimiento de microorganismos en medio sólido se centran en el uso de técnicas no invasivas. Además de monitorear las colonias microbianas sin alterar el ambiente ni desechar la muestra, estas técnicas presentan la ventaja de poder obtener datos cuantitativos de forma rápida y más precisa (Lobete et al., 2015). La microcalorimetría es una de ellas donde, con una grabación continua en tiempo real, se puede relacionar cuantitativamente la cantidad de calor liberado por el cultivo microbiano con diversos parámetros del mismo (Birou et al., 1987), empleado en la monitorización del crecimiento de colonias de *L. lactis* sobre sistemas sólidos (Kabanova et al., 2013).

2.1 Análisis de imagen

El uso de técnicas de microscopía para la monitorización colonial a través de las imágenes obtenidas está ganando mucho interés en la investigación del crecimiento colonial debido al desarrollo de nuevos programas y herramientas que hacen más factible y automático el procesado de imagen (Skandamis et al., 2007; Lobete et al., 2015). Aparte de las técnicas más sofisticadas de fluorescencia ya mencionadas, los esfuerzos actuales para mejorar el estudio colonial se centran principalmente en una combinación de microscopía óptica acoplada a cámaras digitales y, por otro lado, medidas de densidad óptica (Lobete et al., 2015).

Al utilizar una combinación de microscopía óptica y cámaras digitales, las colonias se pueden observar inmortalizando su evolución por video o imagen para un posterior procesamiento o estudio de la dinámica de crecimiento y obtención de los parámetros más comunes de éstas como el radio o el área, así como la tasa de crecimiento o la fase lag (Lobete et al., 2015). Existen diferentes programas en el mercado para el recuento automático del número de colonias en placa que también permiten su caracterización (Puchkov, 2010). La calidad de la imagen dependerá del poder de resolución de la cámara fotográfica y de la buena iluminación de forma incidente o transmitida (Corkidi et al., 1998). Las imágenes se procesan con un software de análisis de imagen, el cual, tras una corrección de la iluminación si se necesita, realizará una segmentación por umbral de la imagen, principalmente por una gradación en niveles de gris, para diferenciar las colonias del propio medio (Robinson et al., 1998; Puchkov, 2010).

Como no existe un software universal para el análisis de imagen de colonias, en cada estudio se utiliza el que mejor convenga, o se diseña un programa específico (Tabla 2). Se han desarrollado

sistemas de análisis de imagen para agilizar el tratamiento de imágenes con arrays de microcolonias procedentes del análisis del crecimiento de mutantes en placa. Entre ellos destacan el sistema *Growth Detector* y el *Colonyzer*. El primero de ellos se encuentra programado en MATLAB y hace una segmentación de las imágenes en escala de grises por el método Otsu tras la cual establece un mapa de áreas ordenadas según el gen mutante de cada colonia (Memarian et al., 2007). El segundo de ellos incluso detecta colonias de muy baja densidad celular gracias a una segmentación doble de la imagen (Lawless et al., 2010).

Tabla 2. Algunos ejemplos de programas diseñados o software empleado para el análisis de imágenes de colonias.

Programa, Software	Uso	Bibliografía
Semper 6, Colony	Conteo de colonias, diámetro y coeficiente de circularidad (<i>B. cereus</i>)	Wimpenny et al., 1995b
Image Pro Plus	Area colonias superficiales (<i>L. monocytogenes</i>)	Dykes, 1999
	Area colonias sumergidas (<i>E. coli</i>)	Skandamis et al., 2007
MATLAB	Área colonias e intensidad de píxeles (<i>L. monocytogenes</i>)	Guillier et al., 2006
	Área colonias (<i>S. cerevisiae</i>)	Memarian et al., 2007 Binder et al., 2015
Colonyzer	Tamaño, granularidad, color de colonias (<i>S. cerevisiae</i>)	Lawless et al., 2010

Un gran paso es la compilación secuencial de una serie de imágenes obtenidas a intervalos cortos de tiempo hasta obtener un video donde poder analizar las divisiones celulares, la cinética de crecimiento o la heterogeneidad celular (Koutsoumanis y Lianou, 2013).

En cultivos líquidos, por medio de espectrofotómetros o aparatos lectores de microplacas, la densidad óptica (DO) es un método indirecto rápido de determinar la concentración microbiana gracias a la ley de Lambert-Beer. Para el análisis del crecimiento colonial, en el estudio de Wimpenny et al., (1995b) también se creó un subprograma denominado “ColOD1” que podía transformar las imágenes de transmisión de colonias en 256 niveles de grises y, posteriormente, en datos de absorbancia aplicando la ley de Lambert-Beer (Figura 4). Dicho programa también fue utilizado por McKay y Peters en 1997 hallar la μ de células situadas en diferentes puntos superficiales de la colonia.

Mertens et al., en sus trabajos del 2011 y 2012 con colonias de *Z. bailli* y *E. coli* respectivamente, también proponen la monitorización de su densidad óptica con equipos de alta resolución como método para cuantificar su dinámica de crecimiento. Para ello utilizan lectores de microplacas

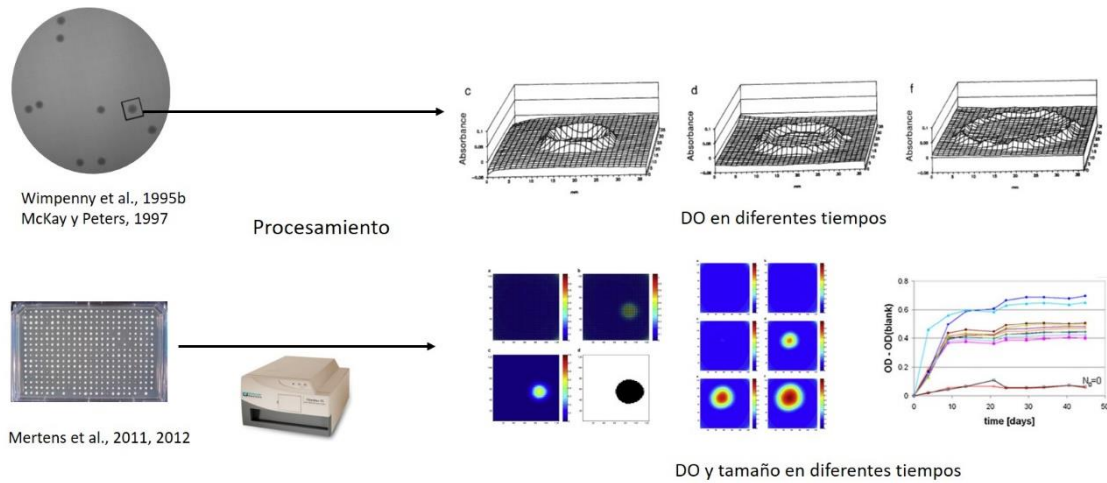


Figura 4. Ejemplos de la aplicación de medidas de DO en el estudio con colonias.

que miden la DO en diferentes posiciones de la colonia que hay en cada pocillo, tanto superficiales como sumergidas y, posteriormente son procesadas con MATLAB para definir un valor umbral de DO que separe los objetos (colonias) del medio, en forma de imágenes binarias matriciales, hasta obtener su DO y su tamaño (Figura 4).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas utilizadas y ecuaciones DO₆₂₀ Vs UFC/ml

Para este estudio se emplearon cuatro cepas de varias especies de levaduras con diferentes requerimientos de oxígeno: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, fermentativa, *Rhodotorula glutinis* CECT 10145, levadura oxidativa estricta, y *Debaryomyces fabryi* PR66 y *Zygosaccharomyces rouxii* Bch, dos levaduras con metabolismo tanto oxidativo como fermentativo y cuyas cepas fueron aisladas en nuestro laboratorio a partir de chorizo y bollo de chocolate respectivamente.

Todas estas cepas, conservadas a -80°C en glicerol al 20 % (v/v), se sembraron en placas o tubos con YMA (0,5 % (p/v) de extracto de levadura (Difco Laboratories, Michigan, Estados Unidos), 0,3% (p/v) de proteosa peptona No.3 (Difco), 0,3 % (p/v) extracto de malta (Difco), 1 % (p/v) de glucosa (Panreac Química S.A., Barcelona, España) y 2 % (p/v) de agar como agente solidificante, y tras su crecimiento a 28°C se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

Para cada cepa se halló previamente la relación existente entre UFC/ml y la densidad óptica a 620 nm. Para ello, se inoculó una pequeña cantidad de biomasa en 100 ml de medio YMB (misma composición que YMA pero sin agar) en matraces de 250 ml y se incubaron a 28°C en agitación (120 rpm) durante aproximadamente 10 h hasta obtener valores de DO a 620 nm (DO₆₂₀) próximos a 1. A partir de sus diluciones en YMB cuyos valores de DO₆₂₀ estaban comprendidos entre 0,1 y 1, se halló el número de UFC/ml por siembra y recuento en placa (Miles et al., 1938). Los datos se ajustaron a una recta por regresión lineal empleando el paquete estadístico del programa Excel (Microsoft Office, 2013), obteniendo las ecuaciones para cada cepa de la Tabla 3.

Tabla 3. Ecuación resultante de la relación entre la DO₆₂₀ y el Log (UFC/ml) de cada una de las cepas y su coeficiente R².

Cepa	Ecuación	R ²
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	Log (UFC/ml)= 5,94 + 1,58 · DO ₆₂₀	0,95
<i>R. glutinis</i> CECT 10145	Log (UFC/ml)= 6,21 + 1,38 · DO ₆₂₀	0,97
<i>D. fabryi</i> PR66	Log (UFC/ml)= 6,16 + 1,19 · DO ₆₂₀	0,98
<i>Z. rouxii</i> Bch	Log (UFC/ml)= 5,10 + 1,10 · DO ₆₂₀	0,93

2. Medio líquido

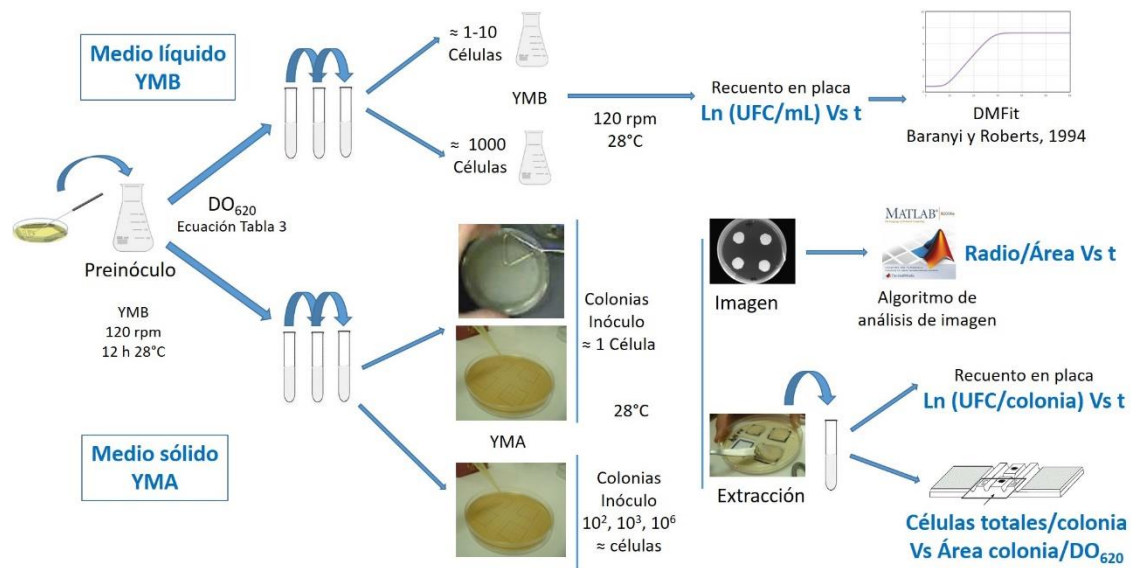


Figura 5. Procedimiento seguido para el análisis del crecimiento en medio líquido y sólido.

2.1 Obtención de inóculos

El análisis del crecimiento de las cepas de las levaduras se realizó en un medio líquido general, YMB. En primer lugar, para obtener los preinóculos exponenciales de las cepas con los que inocular los matraces de estudio, se añadió una pequeña cantidad de biomasa en matraces de 100 ml de YMB y tras su crecimiento durante toda la noche (12 h) a 120 rpm y 28°C, se midió su DO_{620} y con las ecuaciones (apartado 1) de cada cepa se calcularon las diluciones pertinentes a hacer en medio YMB hasta obtener en 100 μl , de 1 a 10 o 1000 células. Con esos preinóculos de 100 μl , se inocularon al menos tres matraces de 250 ml por cada cepa que contenían 99,9 ml de YMB, incubándose a 28°C y en agitación (120 rpm) durante más de 500 h (Figura 5).

2.2 Análisis del crecimiento en medio líquido

Para analizar a lo largo del tiempo el crecimiento de las cepas, se tomó 1 ml de cada matraz (o de alguna de sus diluciones cuando el crecimiento es muy denso) en intervalos de tiempo más frecuentes en las primeras horas de crecimiento que en las últimas horas del seguimiento. Se midió su DO_{620} y se realizaron las diluciones decimales oportunas en tubos de 9 ml de suero salino (NaCl al 0,9 % p/v) para realizar el recuento de UFC/ml siguiendo el método de Miles y Mishra (Miles et al., 1938): se sembraron 4 réplicas de 50 μl de las diluciones pertinentes en placas de YMA y se incubaron a 28°C durante 24-48 h, tras lo cual se contaron las colonias en los puntos de inoculación hasta obtener el valor medio de UFC/ml.

Los datos de Ln (UFC/ml) de cada cepa obtenidos en medio líquido a lo largo del tiempo, fueron modelizados a través de la utilización de la aplicación web DMFit (<http://browser.combase.cc/DMFit.aspx>) (Figura 5). Dicha aplicación permite ajustar los datos al modelo de Baranyi y Roberts (1994), al modelo completo (fase lag, exponencial y estacionaria) o al modelo sin fase lag. Con esta aplicación, se obtienen los datos correspondientes al modelo ajustado, los parámetros de buen ajuste, como el error estándar del modelo y los parámetros del propio modelo junto con su error estándar: el tiempo lag si lo hubiera, Ln (N_0) o inóculo inicial, μ y Ln (N_{max}) o la población máxima que alcanza. Algunos de estos parámetros fueron comparados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 5 % y utilizando el estadístico F de Fisher del programa Excel (Paquete Microsoft Office, 2013). La aplicación DMFit también se utilizó con algunos datos del crecimiento de células viables en colonias.

3. Medio sólido

3.1 Obtención de inóculos y condiciones de crecimiento

Se estudió el crecimiento de colonias originadas por cuatro inóculos iniciales, aproximadamente 1, 10^2 , 10^3 y 10^6 células. Los precultivos exponenciales con los que inocular las placas se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento detallado en el apartado 2.1 correspondiente al medio líquido.

Para inóculos de aproximadamente 1 célula, se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener del orden de 5-10 células en 100 μ l, volumen que se expandió con asa de Drigalsky en placas que contenían 15 ± 1 ml de YMA. Únicamente se consideraron para el estudio aquellas placas que contuvieran entre 4 y 10 colonias bien separadas entre sí. Con el objetivo de analizar el crecimiento de las colonias cuando éstas todavía no son visibles, se inocularon gotas con 50 μ l (con 1 o 2 células aproximadamente) en regiones rotuladas de 4 cm^2 cada una (Figura 5) para su posterior escisión.

Para los inóculos de 10^2 , 10^3 y 10^6 células, se obtuvieron gotas de 10 μ l con aproximadamente esa cantidad de células y se depositaron dentro de las regiones de 4 cm^2 anteriormente mencionadas de placas de Petri, con 15 ± 1 ml de medio YMA (Figura 5). En el caso de la obtención de inóculos de 10^6 células, previamente a la realización de las diluciones correspondientes, se centrifugó el preinóculo a 4000 rpm durante 4 minutos con el fin de concentrar las células hasta alcanzar el inóculo deseado en 10 μ l.

Una vez inoculadas las placas, se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C durante su seguimiento.

3.2 Determinación del crecimiento de levaduras en medio sólido

Periódicamente, en intervalos de tiempo más frecuentes en las primeras horas de crecimiento y menos frecuentes en las últimas horas de seguimiento, se analizaron de cada especie: i) tres colonias de diferentes placas en cada tiempo, que se extrajeron para obtener todos los parámetros de crecimiento y generar así lo que denominamos “colonia virtual”; ii) otras tres colonias de distintas placas a las que se le hizo un seguimiento en todos los tiempos de los parámetros que no requerían de su extracción de la misma. Los parámetros que se valoraron se detallan a continuación.

3.2.1 Medida del área y radio

Se tomaron fotografías digitales en escala de grises de las placas que contenían las colonias de estudio (Figura 5), con el capturador y analizador de imágenes Vilber Lourmat. La toma de imágenes se realizó desde la misma distancia en cada tiempo, y con ayuda de una regla para poder cerciorarse de la correcta conversión de escala de píxeles a milímetros.

Para la obtención automática y precisa de parámetros físicos de las colonias como radio, área, circularidad, etc., se ha desarrollado un algoritmo de análisis de las imágenes con el software MATLAB versión 7.0 (The MathWorks, Inc., Massachusetts, Estados Unidos) cuyos detalles se muestran en el apartado de resultados. Los datos obtenidos con el algoritmo se validaron comparándolos con los obtenidos de forma manual midiendo el diámetro de las colonias como la media de las medidas en dos direcciones perpendiculares y, posteriormente, generando el valor del radio y área asumiendo una forma circular. Los valores de área y radio en cada tiempo se corresponden a la media de tres colonias independientes.

3.2.2 Determinación del número de células viables y totales por colonia

Una vez tomadas las fotografías, se procedió a la extracción de tres de las colonias para obtener datos del número de células. Para ello, en condiciones asépticas se recortó con una espátula flameada en alcohol el agar de 4 cm² donde se había depositado la gota con el inóculo cuando las colonias aún no son visibles y, cuando ya son visibles, el agar que contenía a la colonia (Figura 5). Posteriormente se suspendió la colonia en tubos con 10 ml de volumen final de suero salino al 0,9 % p/v por agitación vigorosa. Después se realizaron diluciones decimales seriadas en suero

salino para realizar el recuento en placa por el método de Miles y Mishra como se detalla en el apartado 2.2 de medio líquido, y así obtener el número de UFC por colonia.

Partiendo también de la suspensión de la colonia o de sus primeras diluciones decimales, se valoró la DO_{620} de cada una de ellas y además se realizó un recuento de células totales microscópicamente en cámara de Thoma (Figura 5) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X \cdot \frac{10^6 \text{ levaduras}}{\text{colonia}} = \frac{N^\circ \text{ células} \cdot \text{cuadrados de la cámara} \cdot 1000 \text{ mm}^3}{N^\circ \text{ cuadrados} \cdot \text{volúmen cámara}} \cdot 10 \text{ mL}$$

Siendo el N° de células el número de células contadas en un N° de cuadrados, en este caso 20 cuadrados pequeños de $0,0025 \text{ mm}^2$, del total de *cuadrados de la cámara*, 400, cuya cámara tiene un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$. Multiplicando el valor obtenido por 10 ml que es el volumen de la suspensión de las células de la colonia (y por la dilución pertinente en el caso de tomar la muestra de alguna dilución) obtuvimos el número de células de la misma. Se realizó el recuento del número de grupos celulares para su comparación más correcta con las UFC. Para cada colonia, se hizo la media de dos recuentos independientes.

A partir de los datos obtenidos con todos los recuentos, se determinó la relación existente entre el logaritmo neperiano del número de grupos celulares totales/ml y la DO_{620} de la suspensión de la colonia, para aquellos datos cuya DO_{620} está comprendida entre 0,1 y 1. Se ajustaron a una recta de regresión lineal empleando el paquete estadístico del programa Excel (Microsoft Office, 2013). Las ecuaciones que se obtuvieron aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Ecuaciones que relacionan el Ln de la DO_{620} y el Ln del número de grupos celulares/ml de la suspensión de las colonias de cada una de las cepas, así como su coeficiente R^2 .

Cepa	Ecuación	R^2
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	$\text{Ln (Grupos cels/ml)} = 17,25 + 1,31 \cdot \text{Ln } DO_{620}$	0,85
<i>R. glutinis</i> CECT 10145	$\text{Ln (Grupos cels/ml)} = 17,75 + 1,25 \cdot \text{Ln } DO_{620}$	0,85
<i>D. fabryi</i> PR66	$\text{Ln (Grupos cels/ml)} = 17,43 + 1,19 \cdot \text{Ln } DO_{620}$	0,88
<i>Z. rouxii</i> Bch	$\text{Ln (Grupos cels/ml)} = 16,37 + 1,18 \cdot \text{Ln } DO_{620}$	0,75

Con dichas ecuaciones, a raíz del valor de DO_{620} de la suspensión de las células de cada colonia, se calculó de forma más precisa y rápida el valor de grupos de células/ml que, al multiplicarlo por los 10 ml de la suspensión, obtendríamos el número de grupos en la colonia comparables al número de UFC de la misma.

3.2.3 *Determinación del consumo de glucosa*

Se analizó a modo de ejemplo el consumo de glucosa en medio líquido y sólido en cultivos de *S. cerevisiae* ATCC 7754. Para ello, a partir de los cultivos en medio líquido de 100 ml inoculados con aproximadamente 10^3 células, periódicamente se fueron tomando muestras de 1 ml. En cultivos sólidos, a partir de las placas donde estaban creciendo 4 colonias originadas también por aproximadamente 10^3 células, se tomó y se pesó periódicamente una muestra de agar del centro de la placa con sacabocados y se suspendió durante 1 h con 1 ml de agua destilada. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante un minuto para la eliminación de restos celulares y de agar y obtener los sobrenadantes.

Para la valoración de la cantidad de glucosa de las muestras se empleó el kit enzimático Glucose (HK) Assay Kit (Sigma Chemical Company, Misuri, Estados Unidos) que se basa en dos reacciones consecutivas donde la glucosa en primer lugar, se fosforila a glucosa-6-fosfato por medio de una hexoquinasa y este consecutivamente es oxidado a 6-fosfatogluconato por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, produciendo NADH. La cantidad de NADH generado es equimolar con la cantidad de glucosa presente, por lo que su detección mediante densidad óptica a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de glucosa de la muestra. Se mezcló 1 ml del agente reactivo que contiene las enzimas y moléculas asociadas con 0,1 ml del sobrenadante recogido y diluido de las muestras y, tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la DO a 340 nm. Los valores de DO_{340} se intercalaron en una recta patrón para obtener la concentración de glucosa, realizada previamente con suspensiones de distintas concentraciones de glucosa:

$$\text{Concentración de glucosa (g/l)} = 0,4118 \cdot DO_{340} + 0,0085 \quad R^2 = 0,9967$$

3.2.4 *Modelización de los datos de crecimiento*

Los datos de crecimiento obtenidos a lo largo del tiempo fueron ajustados de acuerdo a una adaptación de diversos modelos ya existentes.

El ajuste a modelos lineales se realizó utilizando el método de regresión lineal del paquete de análisis de datos del programa Excel (Microsoft Office, 2013), que proporciona los valores coeficiente de la variable X y de la intercepción con el eje, así como sus errores típicos. Para la comparación de la bondad de ajuste se empleó el coeficiente de determinación múltiple, R^2 , que aporta dicho paquete, así como el valor de la raíz del error cuadrático medio (*Root Mean Square*

Error, RMSE). Este tipo de aproximación lineal se empleó para el crecimiento del Ln (UFC/colonia) en las primeras horas (modelo exponencial de crecimiento clásico), así como con el radio (Ley de crecimiento lineal de Pirt, 1967; 1975) y el área de las colonias (Ley de crecimiento del área, Cooper et al., 1968), y también para el estudio de la relación lineal existente entre el área y el número de grupos totales celulares.

Para el ajuste de los datos a modelos no lineales, se empleó el ajuste de mínimos cuadrados junto con la aplicación Solver del paquete de análisis de datos del programa Excel (Microsoft Office, 2013), el cual obtiene los valores de los parámetros del modelo que más se ajustan a los datos experimentales y, además, se utilizó el valor RMSE para comparar la bondad de ajuste de los distintos modelos no lineales. Este tipo de ajuste se utilizó para la modelización sigmoide del área de las colonias y para el crecimiento del Ln (UFC/colonia) a lo largo del tiempo.

Para estimar los valores de los parámetros de la ecuación del crecimiento del área, comunes a todos los inóculos, se realizó una regresión no lineal a través del algoritmo de Marquardt. La bondad del ajuste de este modelo se analizó por medio de *run test* (Bradley, 1968) con el programa Stata 9.0 (Stata Corp., Texas, Estados Unidos) en colaboración con el Departamento de Biomatemática de la Facultad de Biología de la UCM.

En la comparación de la aplicación de distintos modelos a los datos de células viables, radio y área así como para la validación de los modelos y relaciones, se emplearon el RMSE, el *Bias Factor* o factor de sesgo y el *Accuracy Factor* o factor de exactitud (Ross, 1996). Para la comparación de los valores estimados para algunos parámetros de crecimiento se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 5 % y utilizando el estadístico F de Fisher del programa Excel (Paquete Microsoft Office, 2013). En otros casos se asumió una distribución normal de los parámetros comparados, como es el caso de las μ (Martínez-Peinado y Van Uden, 1977) de forma que el 95 % de los valores en torno a la media están incluidos en un intervalo que abarca desde la media $\pm 1,96$ x error típico, y se compararon las diferencias significativas entre los rangos.

3.3 Análisis del crecimiento de colonias de levadura a distintos valores de pHs y en presencia de sorbato potásico

De la misma forma que se ha analizado el crecimiento de colonias en placas de YMA al 1 % de glucosa, siguiendo todo el procedimiento descrito en los anteriores apartados y partiendo de colonias originadas por inóculos de 100 células, se analizó el crecimiento de varias especies de

levaduras en placas con 15 ml de YMA a pH cercano a 7 y 5,6 y a las concentraciones de 0 y 0,75 g/l de sorbato potásico. De igual modo, estas placas se incubaron a 28°C y de forma periódica se iban obteniendo los datos de Ln (UFC/colonia) y área. Las cepas que se analizaron fueron *S. cerevisiae* ATCC 7754, *S. cerevisiae* EPD 1.1.2, *D. hansenii* EPEC 1.3, *D. hansenii* CBS 766, *D. fabryi* PR66, *Z. rouxii* Bch y *Z. rouxii* TYN 1.3.

Adicionalmente, se han aplicado los datos de crecimiento a la ecuación simple para ácidos débiles descrita por Quintas et al., (2005): $\mu_0/\mu=1+W/Kw$ donde μ_0 y μ son la tasa específica de crecimiento en ausencia y en presencia del conservante, W la concentración externa de ácido débil (mM) y Kw , el parámetro a determinar en cada especie, que indica la concentración de ácido a la que la mitad de la tasa de consumo de sustrato se desvía al mantenimiento celular frente a estrés por ácidos débiles.

RESULTADOS**1. Análisis del crecimiento de UFC de levaduras en medio sólido (YMA) y líquido (YMB)****1.1 Comparación del crecimiento de UFC de levaduras en medio sólido y en medio líquido**

Utilizando el mismo método de obtención de los datos de células viables tanto en líquido como en el mismo medio solidificado con un 2 % de agar se comparó la evolución temporal del crecimiento en cuanto a UFC. Como las colonias crecen sobre un volumen de medio YMA en placa de 15 ml, los resultados de UFC/ml obtenidos en medio líquido se calcularon para un volumen final de 15 ml.

Tabla 5. Tasa específica de crecimiento (μ) \pm error estándar, valor R^2 y error estándar del ajuste de los datos de crecimiento de UFC en líquido o en sólido al modelo de Baranyi y Roberts, (1994).

Cepa	Inóculo inicial (células)	Tipo de medio	μ (h^{-1})	Error estándar
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	1-10	Líquido (YMB)	$0,56 \pm 0,02$	0,26
		Sólido (YMA)	$0,53 \pm 0,06$	0,94
	≈ 1000	Líquido (YMB)	$0,57 \pm 0,03$	0,46
		Sólido (YMA)	$0,47 \pm 0,04$	0,53
<i>Z. rouxii</i> Bch	1-10	Líquido (YMB)	$0,18 \pm 0,01$	0,44
		Sólido (YMA)	$0,16 \pm 0,02$	1,01
	≈ 1000	Líquido (YMB)	$0,19 \pm 0,03$	0,93
		Sólido (YMA)	$0,24 \pm 0,03$	0,58
<i>D. fabryi</i> PR66	1-10	Líquido (YMB)	$0,54 \pm 0,01$	0,26
		Sólido (YMA)	$0,47 \pm 0,08$	1,43
	≈ 1000	Líquido (YMB)	$0,58 \pm 0,06$	0,69
		Sólido (YMA)	$0,50 \pm 0,04$	0,41
<i>R. glutinis</i> CECT 10145	1-10	Líquido (YMB)	$0,51 \pm 0,05$	0,57
		Sólido (YMA)	$0,34 \pm 0,04$	1,20
	≈ 1000	Líquido (YMB)	$0,48 \pm 0,05$	0,55
		Sólido (YMA)	$0,46 \pm 0,05$	0,77

En la Figura 6 aparecen representados los resultados de Ln de UFC como la media de tres muestras o colonias extraídas de muestras independientes junto con su desviación típica, en círculos azules las de medio líquido y en rojo las de medio sólido. Las curvas discontinuas se generaron tras el ajuste de los datos al modelo de Baranyi y Roberts, (1994) con la aplicación

Inóculo 1-10 células

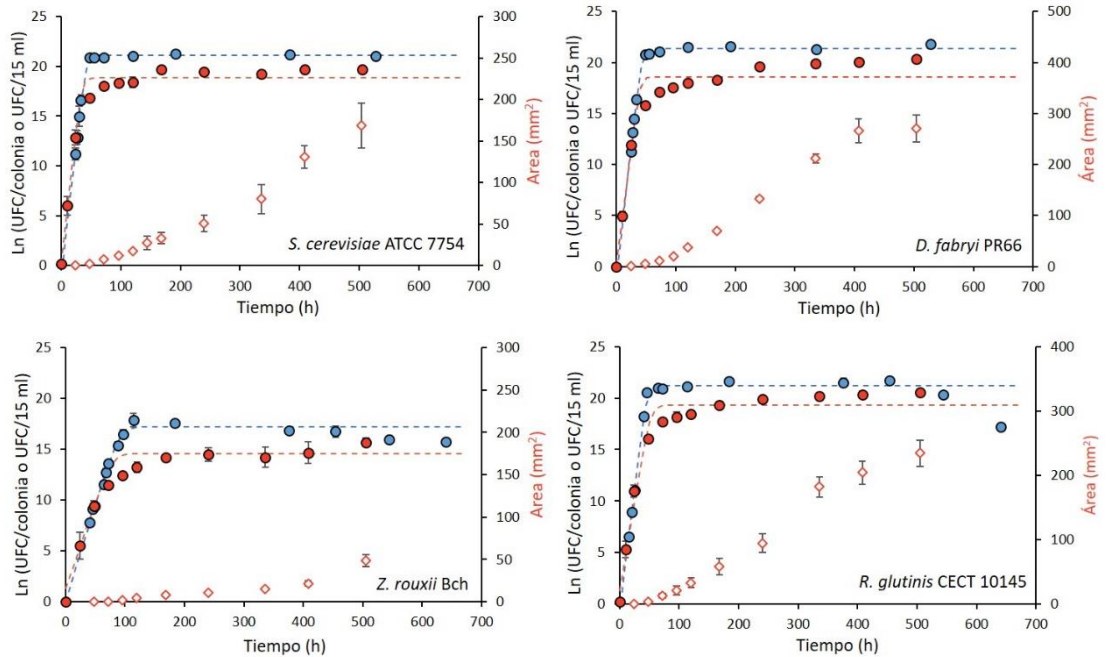
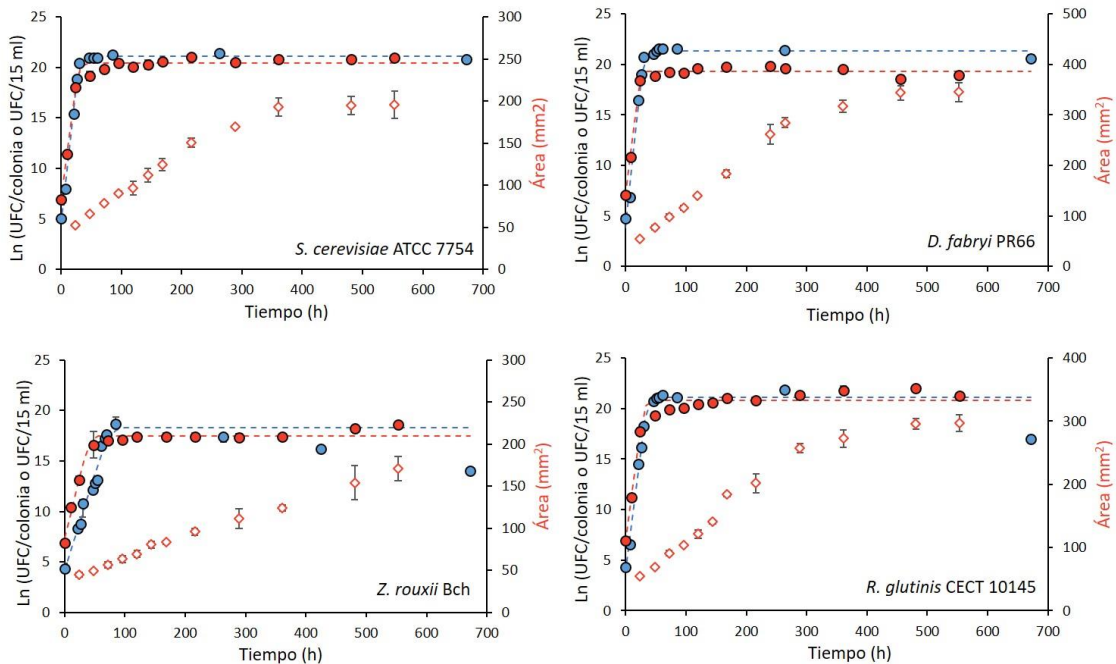
Inóculo \approx 1000 células

Figura 6. Comparación del crecimiento de células viables en YMB (círculos azules) e YMA (círculos rojos) como UFC por 15 ml de medio de cultivo líquido o por colonia respectivamente (media y desviación típica de tres muestras o colonias). Las líneas discontinuas son los ajustes obtenidos por el modelo de Baranyi y Roberts, 1994. Los rombos indican el valor medio y la desviación estándar del área de tres colonias estudiadas en cada tiempo.

DMFit. Con ella se obtuvieron, entre otros parámetros, los valores de μ para cada uno de los cultivos, así como el error estándar del modelo (Tabla 5). Observando la Figura 6 y de acuerdo a

un menor error estándar del ajuste, por lo general se denota que el modelo de Baranyi y Roberts sin Lag se ajusta mejor a los datos de UFC obtenidos en medio líquido que a los obtenidos en medio sólido. Para todas las especies, en ambos tipos de medios e inóculos se aprecia que inicialmente existe una primera fase común de crecimiento exponencial con tasas de crecimiento máximas y muy similares en ambos tipos de medios e inóculos iniciales (Tabla 5). De hecho, el ANOVA realizado con estos datos corroboró, con valores de $F < F_{\text{crítico}}$ y P-valor superiores a 0,05, que el tipo de medio (líquido o sólido) y la cantidad de inóculo no ejercían un efecto significativo sobre el valor de μ en esta primera fase exponencial. En medio sólido, esta fase exponencial tiene lugar cuando las colonias todavía no son visibles o son muy pequeñas y su duración es más corta, tanto en líquido como en sólido, a medida que el inóculo inicial es mayor.

Tras esta fase exponencial, en los cultivos líquidos se pasa a una fase estacionaria de forma drástica (Figura 6), al contrario de lo que ocurre en las colonias, donde parece observarse una entrada lenta y progresiva en la siguiente fase. En la mayoría de las especies, y más pronunciado en las colonias originadas por 1-10 células, este cambio paulatino de fases durante el crecimiento de células viables dentro de las colonias no está bien representado por el cambio más drástico entre fases del modelo de Baranyi y Roberts. Esto se corrobora visualmente en la Figura 6 y estadísticamente con los valores más altos del error estándar que presenta el ajuste del modelo de Baranyi y Roberts a los datos de células viables en medio sólido, especialmente con inóculos iniciales de 1-10 células donde ese cambio de fase es más visible al ser más lento (Tabla 5).

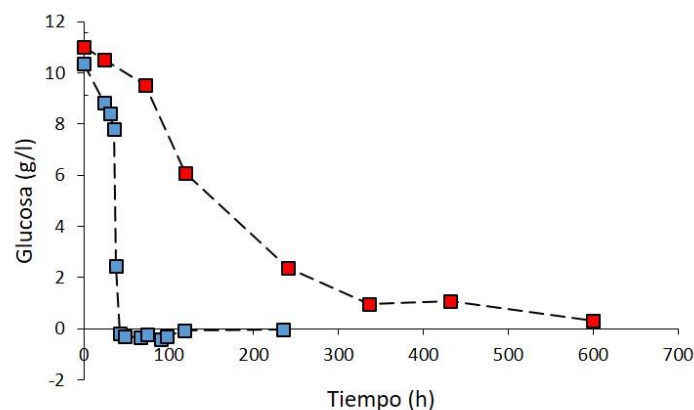


Figura 7. Comparación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo a lo largo del crecimiento de *S. cerevisiae*. El rojo se corresponde a placas de YMA con cuatro colonias generadas por un inóculo inicial de 1000 células cada una. El azul se corresponde a cultivos de YMB con inóculo de 1000 células aproximadamente. Cada punto es la media junto con la desviación estándar de tres muestras independientes estudiadas en cada tiempo.

La fase estacionaria que se alcanza posteriormente a este periodo es una fase de clara detección en medio líquido (Figura 6) porque está muy bien descrita y representada por el modelo de Baranyi y Roberts y además, porque al analizar la concentración de glucosa en cultivos líquidos de *S. cerevisiae* (Figura 7) se observa que esta disminuye drásticamente hasta agotarse en la entrada a esta fase estacionaria. En medio sólido, sin embargo, la fase que podría denominarse igualmente como estacionaria, aunque no se puede asegurar con una significancia estadística clara, se caracteriza o por un lento crecimiento apenas perceptible en el gráfico semilogarítmico o casi un mantenimiento del número de células viables. Sin embargo, esta fase en medio sólido se encuentra acompañada a su vez de un incremento claro del área de las colonias hasta el final del seguimiento (Figura 6). Este incremento del área durante esta última fase es del orden de 4-5 veces en colonias originadas por 1-10 células y 2-2,5 veces en las originadas por aproximadamente 10^3 células. También se observa que en esta fase todavía hay glucosa presente en el medio porque su consumo es mucho más lento que en medio líquido (Figura 7). A pesar de que aparentemente se tiende a alcanzar un valor máximo de células en las colonias o una fase estacionaria como ocurre en cultivos líquidos, lo cierto es que el incremento del tamaño de las colonias durante esta fase junto la presencia de glucosa todavía en el medio, indica que nuevas células son incorporadas al menos en el sistema colonial y que por tanto esta fase pueda ser considerada como una fase pseudoestacionaria hasta que se alcance el área máxima.

1.2 Análisis del crecimiento de UFC dentro de la colonia en YMA

A raíz de la observación del apartado anterior de que las células viables en medio sólido crecen inicialmente como en medio líquido, con μ constante y similar, se estableció que la primera fase de crecimiento de las células viables se podía describir por un modelo de crecimiento exponencial cuyos parámetros fueran calculados por regresión lineal simple de los primeros datos de recuento del gráfico semilogarítmico (Tabla 6). Se estudió además el crecimiento de las células viables de todas las cepas en colonias originadas a partir de dos inóculos iniciales más, aproximadamente 10^2 y 10^6 células. Con el nuevo inóculo de 10^2 se obtuvo el mismo patrón de crecimiento, y una fase exponencial con μ similar al resto de los inóculos y a la obtenida en medio líquido (asumiendo una distribución normal (Martínez-Peinado y Van Uden, 1977)). La excepción la marca el mayor de los inóculos, $\approx 10^6$, donde ya desde el principio su μ era estadísticamente bastante inferior. Por tanto, la duración de la fase exponencial disminuye a medida que los inóculos iniciales de las colonias son mayores y, en inóculos cercanos a 10^6 , esta

fase ocurre durante las primeras pocas horas de su crecimiento o simplemente no se detecta (Tabla 6 y Figura 8).

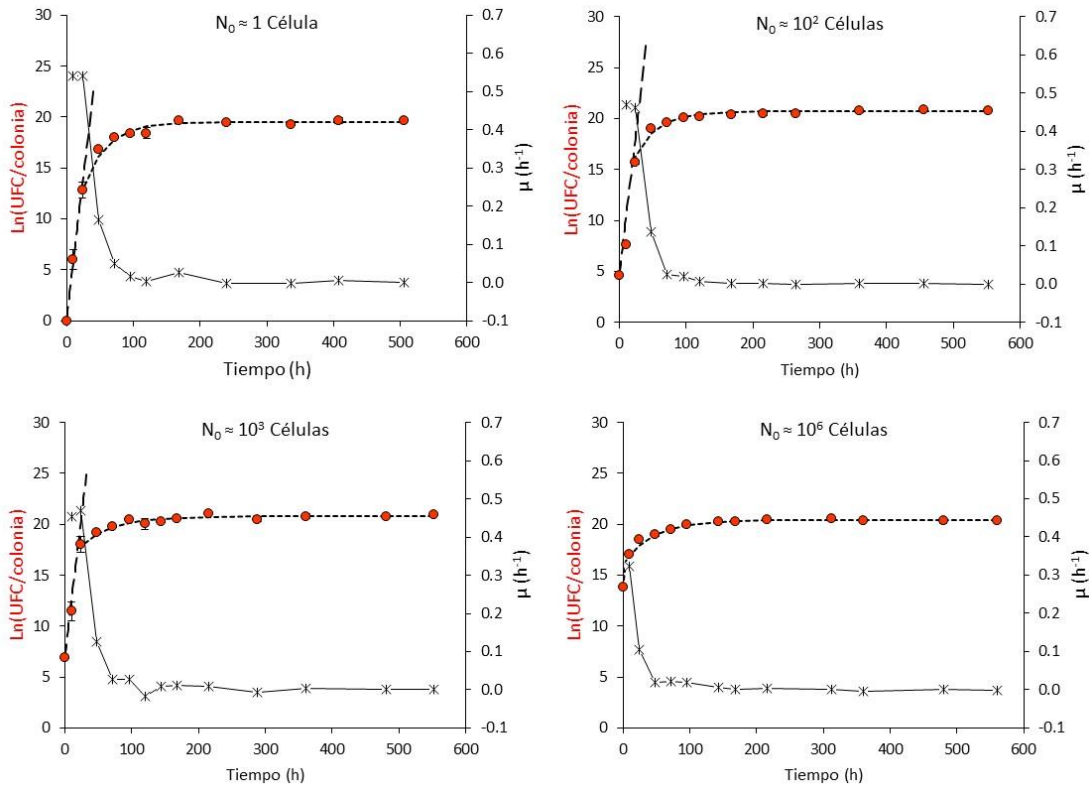
Tabla 6. Parámetros \pm error estándar de los dos modelos que describen el crecimiento de células viables en medios sólidos junto con sus ajustes.

Cepa	$\approx N_0$	Exponencial			Gompertz				
		μ_{exp}	RMSE	R ²	μ_i	Nv_{max}	RMSE	Bias	Acc.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	1	0,54 \pm 0,008	0,30	0,99	0,022 \pm 0,012	4,97·10 ⁸ \pm 2,17·10 ⁸	0,35	1,00	1,02
	10 ²	0,47 \pm 0,075	0,74	0,97	0,029 \pm 0,011	9,15·10 ⁸ \pm 2,33·10 ⁸	0,30	1,01	1,01
	10 ³	0,46 \pm 0,004	0,04	0,99	0,021 \pm 0,012	8,44·10 ⁸ \pm 2,78·10 ⁸	0,20	1,00	1,01
	10 ⁶	0,32 \pm 0,000	0,00	1,00	0,023 \pm 0,014	5,92·10 ⁸ \pm 2,14·10 ⁸	0,21	1,00	1,01
<i>Debaryomyces fabryi</i> PR66	1	0,50 \pm 0,055	0,02	0,99	0,016 \pm 0,008	3,43·10 ⁸ \pm 2,16·10 ⁸	0,57	1,01	1,03
	10 ²	0,51 \pm 0,008	0,08	0,99	0,033 \pm 0,013	2,87·10 ⁸ \pm 1,04·10 ⁸	0,38	1,00	1,02
	10 ³	0,48 \pm 0,004	0,04	0,99	0,020 \pm 0,011	2,49·10 ⁸ \pm 1,05·10 ⁸	0,12	1,01	1,01
	10 ⁶	0,19 \pm 0,107	0,15	0,90	0,017 \pm 0,005	2,49·10 ⁸ \pm 1,34·10 ⁸	0,52	1,01	1,02
<i>Rhodotorula glutinis</i> CECT 10145	1	0,46 \pm 0,006	0,34	0,99	0,012 \pm 0,008	9,61·10 ⁸ \pm 2,47·10 ⁸	0,43	1,01	1,02
	10 ²	0,41 \pm 0,040	0,39	0,99	0,035 \pm 0,018	1,45·10 ⁹ \pm 5,03·10 ⁸	0,64	1,02	1,03
	10 ³	0,45 \pm 0,011	0,11	0,99	0,009 \pm 0,007	1,41·10 ⁹ \pm 1,02·10 ⁹	0,31	1,00	1,01
	10 ⁶	0,31 \pm 0,000	0,00	1,00	0,012 \pm 0,009	9,65·10 ⁸ \pm 4,07·10 ⁸	0,14	1,01	1,01
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> Bch	1	0,20 \pm 0,020	0,38	0,99	0,012 \pm 0,006	2,64·10 ⁶ \pm 6,48·10 ⁵	0,57	1,01	1,04
	10 ²	0,17 \pm 0,023	0,60	0,96	0,033 \pm 0,012	2,93·10 ⁷ \pm 1,51·10 ⁷	0,52	1,01	1,03
	10 ³	0,19 \pm 0,027	0,70	0,96	0,010 \pm 0,004	4,32·10 ⁷ \pm 3,32·10 ⁷	0,43	0,99	1,02
	10 ⁶	0,08 \pm 0,030	0,23	0,87	0,003 \pm 0,001	2,83·10 ⁷ \pm 1,73·10 ⁷	0,52	1,00	1,03

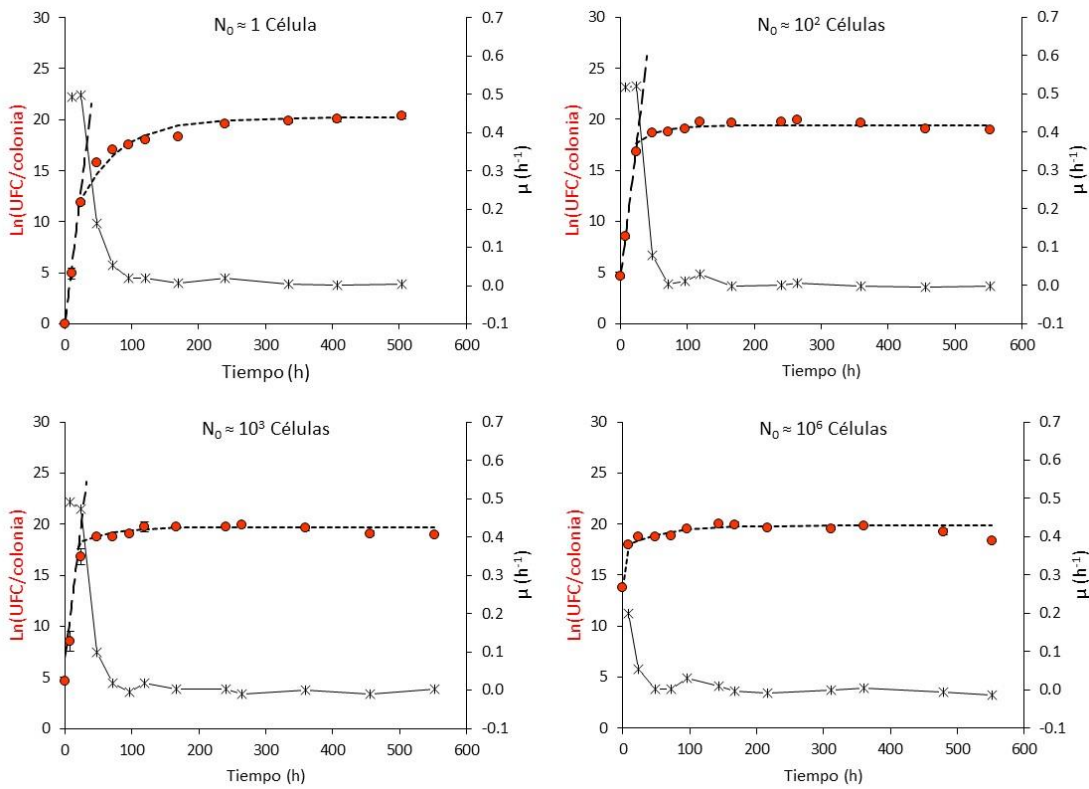
N_0 : inóculo inicial aproximado; μ_{exp} : tasa específica de crecimiento durante la fase exponencial de las colonias (h^{-1}); μ_i : tasa específica de crecimiento en el punto de inflexión de la curva (h^{-1}); Nv_{max} : número máximo de UFC que puede alcanzar dentro de la colonia bajo las condiciones experimentales estudiadas. Errores estándar, RMSE y R² con valores de 0 los dos primeros y 1 el último, indican que solo se pudieron usar dos puntos para su cálculo; Bias: *Bias Factor* o factor de sesgo; Acc.: *Accuracy Factor* o factor de exactitud.

Para la modelización de las dos siguientes fases que se observaron en su crecimiento: el cambio lento y progresivo de fases y la fase estacionaria, se realizaron representaciones de las tasas de crecimiento (μ) calculadas para cada intervalo de tiempo. En todas las especies estudiadas se observó cómo a partir de la fase exponencial con μ constante, ésta iba disminuyendo gradualmente a medida que pasaba el tiempo y se acercaba a una población máxima, hasta llegar a tasas casi nulas (Figura 8). Esto auguraba un crecimiento basado en limitaciones como consecuencia de la población, como ocurre con los modelos sigmoides de crecimiento.

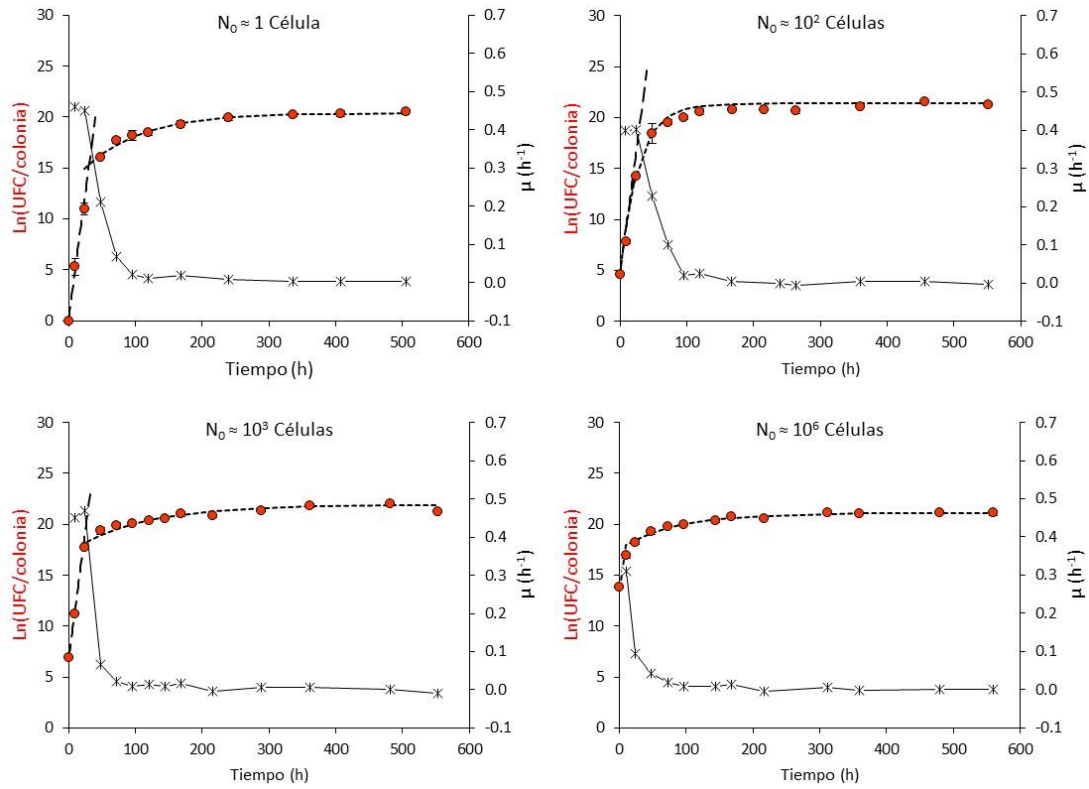
***S. cerevisiae* ATCC 7754**



***D. fabryi* PR66**



R. glutinis CECT 10145



Z. rouxii Bch

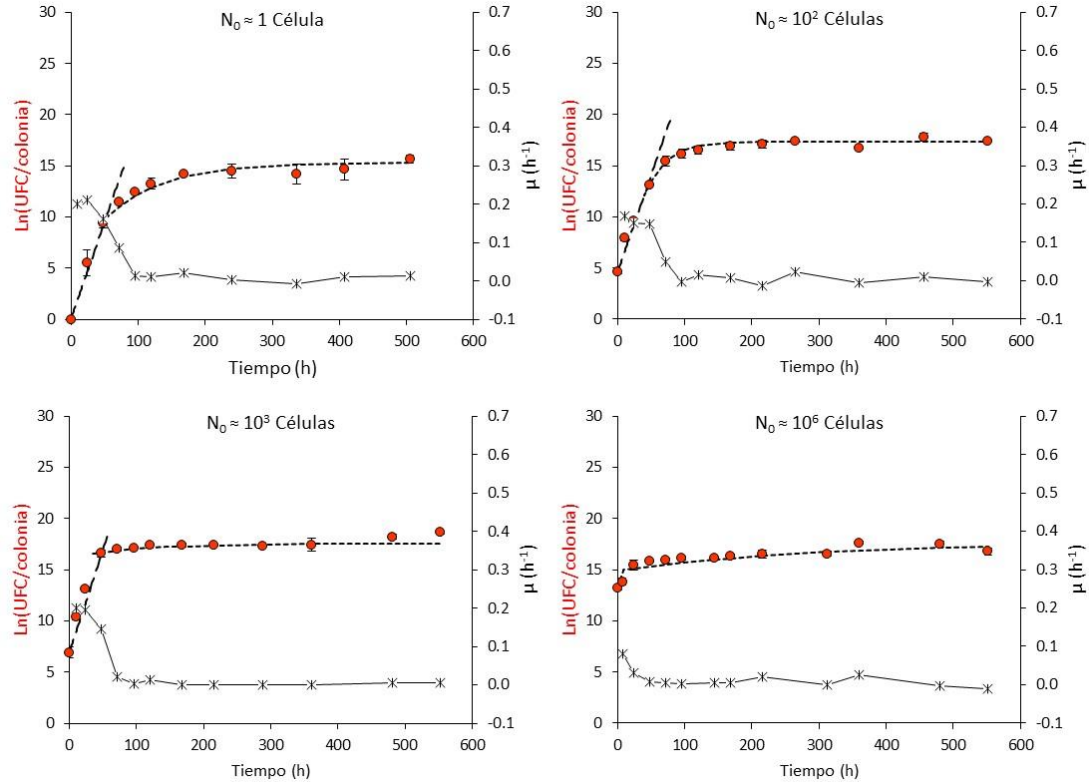


Figura 8. Crecimiento del Ln de UFC/colonia (círculos rojos) junto con la disminución de la tasa específica de crecimiento (μ) a lo largo del tiempo (raya con cruces) de los distintos inóculos iniciales. Medias y desviación estándar de tres colonias en cada tiempo. Las líneas discontinuas indican el ajuste exponencial de la primera fase y el ajuste por Gompertz posteriormente.

La disminución del valor de μ con el tiempo parecía ser exponencial en todas las especies excepto quizás en *Z. rouxii* (Figura 8). Por ello decidimos utilizar el modelo de Gompertz. El modelo de Gompertz (Ecuación 1) posee precisamente la propiedad de que la tasa específica de crecimiento, $\mu(t)$, disminuye exponencialmente con el tiempo o con la población (Ecuaciones 2 y 3 respectivamente). Este modelo tiene varias versiones con distintas reparametrizaciones y nosotros hemos utilizado la versión de Brown y Rothery (1994) (Ecuación 5 de la Introducción general) habiendo sustituido el valor de A por la relación entre la población inicial y la final:

$$Nv = Nv_{max} \cdot e^{-\left(\ln\left(\frac{Nv_{max}}{Nv_0}\right) \cdot e^{-\mu_i \cdot (t-t_0)}\right)} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\mu(t) = \mu_0 \cdot e^{(-\mu_i \cdot t)} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\mu(t) = \mu_0 \cdot \ln\left(\frac{Nv_{max}}{Nv}\right) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde Nv es el número de UFC por colonia, Nv_{max} el número máximo de UFC que puede alcanzar dentro de la colonia bajo ciertas condiciones experimentales, Nv_0 el número de UFC al final de la fase exponencial o al inicio de la fase de transición, t_0 (h) el tiempo de transición entre la fase exponencial y la siguiente fase y, μ_i la tasa específica de crecimiento en el punto de inflexión de la curva. μ_i también se puede definir según estas ecuaciones como la tasa o velocidad a la cual decrece exponencialmente μ desde μ_0 (el valor de μ a tiempo 0 de esta fase, que en nuestro caso se correspondería con el valor de μ del final de la fase anterior exponencial) hasta valores próximos a 0 en la fase estacionaria. En la Figura 8 se observa que esta disminución exponencial de μ en las colonias después de la primera fase de crecimiento, era más clara en todas las especies con inóculos iniciales pequeños.

Como el crecimiento microbiológico se expresa más convenientemente en forma de sus logaritmos naturales, se hizo una transformación logarítmica de la Ecuación 1 a la siguiente:

$$\ln(Nv) = \ln(Nv_{max}) - \ln\left(\frac{Nv_{max}}{Nv_0}\right) \cdot e^{-\mu_i(t-t_0)} \quad \text{Ecuación 4}$$

Esta última ecuación fue la que usamos para el ajuste de los datos de Ln de UFC posteriores a la fase exponencial. Los valores de RMSE, sesgo y exactitud que presenta el ajuste de la ecuación Logarítmica de Gompertz para todos los inóculos iniciales de cada especie son pequeños (Tabla

6), indicando que el modelo de Gompertz puede ser considerado como un buen modelo para describir el crecimiento de las células viables en la colonia posteriormente a la fase exponencial, incluso con inóculos elevados. Además, como se observa en la Figura 8, la curvatura del cambio lento de fases aparece perfectamente representado por dicho modelo en contraposición con el modelo de Baranyi y Roberts de la Figura 6. Los valores estimados para μ_i y Nv_{max} mediante el ajuste de mínimos cuadrados junto con la aplicación Solver, aparecen en la Tabla 6. La tasa de decrecimiento de μ , μ_i , aunque estadísticamente presenta valores similares para todos los inóculos dentro de cada especie (asumiendo una distribución normal (Martínez-Peinado y Van Uden, 1977)), lo cierto es que con inóculos de aproximadamente 10^2 células, esta tasa aparentemente es mayor al resto de los inóculos. El número de UFC máximo que se estima que se alcanza dentro de la colonia, Nv_{max} , varía en función de la cepa, con valores del orden de 10^8 en *S. cerevisiae* y *D. fabryi*, 10^9 en *R. glutinis* y 10^6 - 10^7 en *Z. rouxii*. La comparación estadística de estos valores está obstaculizada por la alta incertidumbre asociada a los datos de recuento celulares. Por lo que parecía conveniente establecer un método más preciso para evaluar el número de células, utilizando parámetros físicos más fácilmente medibles como son el radio o el área de las colonias.

2. Desarrollo de un algoritmo de análisis de imagen para medir el crecimiento de levaduras en medio sólido

En esta Tesis hemos desarrollado un algoritmo de análisis de imagen con el software MATLAB® para la extracción de los parámetros de interés de las colonias en crecimiento de más de 0,1 mm² aproximadamente, empleando las imágenes digitales adquiridas en escala de gris a lo largo del seguimiento. Este algoritmo está formado por cuatro rutinas propias desarrolladas a partir del *Image Processing Toolbox™* del propio programa. La primera de ellas, **mido_colonia**, autoescala en color cada punto de la imagen según el nivel de gris (Figura 9, la escala indica el color asignado a cada nivel de gris). Después establece un umbral de segmentación automático de cada imagen según el nivel de gris, autoajustado para cada una de ellas y, gracias a la aplicación del método *Otsu* (el cual minimiza la varianza dentro los grupos de píxeles clasificados como objetos o fondo y maximiza la diferencia entre los grupos de píxeles considerados como diferentes), identifica por color los objetos de las imágenes (colonias) y los diferencia del fondo (medio) (Figura 6). Esta rutina pregunta además cuántos objetos son de interés en la imagen y permite seleccionarlos gracias al algoritmo de conectividad en vecindario de 4 elementos. Una vez seleccionados, la función *regionprops* permite calcular una serie de parámetros de los

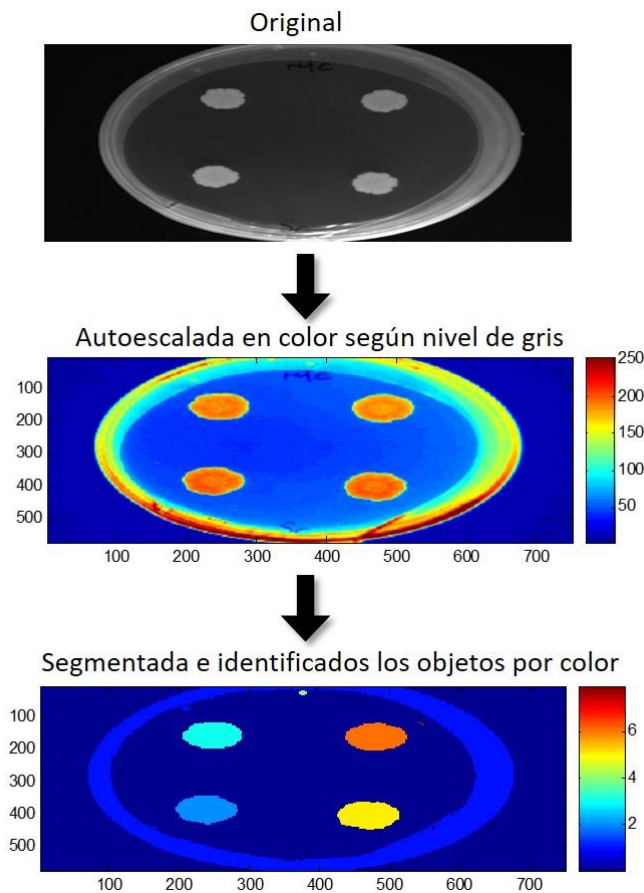


Figura 9. Pasos que realiza el algoritmo de análisis de imagen desarrollado para el estudio del crecimiento de colonias. A partir de la imagen original, el algoritmo realiza un autoescalado en color en función del nivel de gris de cada píxel (en este caso hasta a 250 niveles de gris se le asigna un color) y posteriormente una autosegmentación de la imagen según un nivel de gris umbral autoajustado para cada imagen (en este caso el umbral está en torno al nivel de gris 125 en la barra de color). Después, por aplicación del método *Otsu*, todos los píxeles que tengan un nivel de gris superior al umbral son identificados como objetos (colonias) asignándosele un color (barra de color indica el color de cada objeto), y a los que tengan un nivel de gris inferior, son identificados como medio.

objetos de interés como son el área, el eje menor, el eje mayor, el diámetro equivalente, el coeficiente de circularidad y el perímetro. Los valores más pequeños capaz de medir son 0,3 mm de diámetro y 0,10 mm² de área aproximadamente.

La segunda rutina, **mido_all**, concatena el uso de la rutina anterior para todas las imágenes de un archivo y detecta aquellas que den error.

En cada tiempo de toma de imágenes, también se tomaron imágenes del campo fotográfico con una regla para poder establecer la conversión desde píxeles a milímetros. Para ello se utilizan dos rutinas más. **Micro_escala** permite señalar en la imagen los puntos correspondientes que

delimitan una distancia concreta de la fotografía con la regla, obteniéndose así su valor en píxeles y, **get_all_escala**, concatena su aplicación en todas las imágenes similares.

Para validar el sistema automático de medida, se realizó una medida manual del radio como la media de cinco mediciones de un total de 130 colonias (aproximadamente 33 de cada especie). A partir de ellas se calculó el error relativo de la medición manual. Dicho error relativo medio (Tabla 7) no supera el 1 % de su valor, pero hay que destacar que cuanto más pequeñas eran las colonias (en las primeras 24-72 h de crecimiento), así como más protuberancias o pérdida de circularidad presentaban (en tiempos más tardíos y más frecuente en colonias de *Z. rouxii* y *S. cerevisiae*), el error relativo de la medida manual superó bastante ese 1 %. Por otro lado, el comparar gráficamente la medición manual del radio con la obtenida con el algoritmo (media de la medida quintuple con error relativo igual a 0), puso de manifiesto que el error de predicción medio del tamaño de la colonia no superaba el 3 % para ninguna de las cepas, con coeficientes R^2 muy próximos a 1.

Posteriormente, la validación del ajuste con cerca de 20 nuevos datos de radio para cada especie, arrojó valores de R^2 también muy cercanos a 1 (Tabla 7), lo que confirmó que el ajuste comparativo entre los dos métodos era consistente e independiente de la cepa.

Tabla 7. Comparación de los errores relativos medios de la medición manual, error medio de la predicción del algoritmo, así como la validación del ajuste en las cuatro especies de levaduras estudiadas.

Cepa	Error relativo (%) Medida manual	Error predicción (%) del Algoritmo	R^2 validación Predicho (Algoritmo) Vs Observado (Manual)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	0,76	2,68	0,999
<i>R. glutinis</i> CECT 10145	0,62	1,88	0,993
<i>D. fabryi</i> PR66	0,57	1,25	0,997
<i>Z. rouxii</i> Bch	0,43	2,27	0,997

Se han desarrollado también otras rutinas para aquellas colonias originadas a partir de 10^2 , 10^3 y 10^6 células aproximadamente, en las que durante los primeros días de crecimiento sus correspondientes microcolonias iniciales aún no se hayan unificado por completo. La rutina **mido_colonia_dispersa_sb** primero permite recortar la región que contiene esas microcolonias, después suprime o ajusta el *background* o la iluminación de fondo para que no interfiera en la detección de cada una de esas microcolonias y por último hace una segmentación de la imagen recortada, bien por borde o bien por umbral de gris, permitiendo así cuantificar el área global

de esas microcolonias que todavía no se han unificado. Con la rutina **mido_all_dispersa_sb** se concatena el uso de la rutina anterior para todas las imágenes de un archivo y detecta aquellas que den error. Al ser muchas colonias y muy pequeñas, no existe forma manual de realizar su medida y compararla con la obtenida con estas rutinas de MATLAB. Aun así, los resultados de área de las microcolonias que se obtienen con ellas en los primeros tiempos, concuerdan con el seguimiento posterior del área de las colonias ya unificadas.

3. Análisis de la cinética de crecimiento superficial de la colonia

Con el algoritmo de análisis de imagen se obtienen diversos parámetros del crecimiento superficial de las colonias de levaduras, entre ellos el área, el diámetro menor, el diámetro mayor y el diámetro equivalente (valor del diámetro asumiendo que el dato de área obtenido se corresponde a un círculo perfecto). A partir de estos tres datos de diámetro se obtuvo el radio medio de la colonia en cada tiempo.

En todas las especies estudiadas se observó cómo el tamaño colonial, bien en términos de área o en términos de radio, tendía a un máximo, y que según se iba acercando a él, la velocidad de crecimiento iba disminuyendo, proceso similar al crecimiento sigmoide que ocurría con las células viables a partir de la fase exponencial. A raíz de esa observación se diseñó una ecuación de Gompertz similar a la empleada con el número de células viables (Ecuación 1) para describir tanto el incremento del área de las colonias (Ecuación 5) como de su radio (Ecuación 6). El uso de la misma ecuación para ambos parámetros se debe a que una de las propiedades de la ecuación de Gompertz, como de cualquier exponencial, es que sus potencias siguen siendo también una ecuación de Gompertz. En este caso, el radio es una potencia de 0,5 del área si se asume que las colonias son círculos perfectos.

$$A = A_{max} \cdot e^{-\left(\ln\left(\frac{A_{max}}{A_0}\right) \cdot e^{-\mu_i \cdot (t-t_0)}\right)} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$r = r_{max} \cdot e^{-\left(\ln\left(\frac{r_{max}}{r_0}\right) \cdot e^{-\mu_i \cdot (t-t_0)}\right)} \quad \text{Ecuación 6}$$

En estas ecuaciones A_{max} y r_{max} son la superficie máxima (mm^2) y el radio máximo (mm) que las colonias pueden alcanzar respectivamente bajo unas condiciones ambientales determinadas; A_0 y r_0 son el valor inicial de área y radio a t_0 o que se puede medir; μ_i (h^{-1}) es la tasa específica de

crecimiento en el punto de inflexión de la curva o la tasa o velocidad a cual decrece exponencialmente μ desde un máximo.

3.1 Radio

Inicialmente se estudió el crecimiento del radio siguiendo los dos modelos descritos en la literatura: la “Ley de crecimiento lineal del radio” ($r = Kr \cdot t + r_0$) descrita por Pirt, (1967, 1975) y la posterior “Ley de crecimiento del área” ($r^2 = Ka \cdot t + r_0^2$) descrita por Cooper et al., (1968), donde el radio crece primero a una tasa lineal máxima y constante, Kr (mm/h), y posteriormente el cuadrado del radio lo hace a una tasa Ka (mm²/h). Este modelo en dos fases se comparó con el modelo de crecimiento del radio según la ecuación de Gompertz (Ecuación 6).

Tabla 8. Ajustes de los diferentes modelos empleados para describir el crecimiento del radio de las colonias.

Cepa	$\approx N_0$	Gompertz			Ley de crecimiento lineal del radio $r = Kr \cdot t + r_0$		Ley de crecimiento del área $r^2 = Ka \cdot t + r_0^2$		Combinación $r = Kr \cdot t + r_0$ $r^2 = Ka \cdot t + r_0^2$
		RMSE	Bias	Acc.	RMSE	R ²	RMSE	R ²	RMSE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	1	0,20	0,99	1,04	0,08	0,998	1,08	0,995	0,86
	10 ²	0,06	1,00	1,01	0,05	0,996	3,38	0,921	2,14
	10 ³	0,08	1,00	1,01	0,06	0,996	2,10	0,935	1,12
	10 ⁶	0,05	1,00	1,01	0,05	0,996	2,91	0,886	1,71
<i>Debaryomyces fabryi</i> PR66	1	0,19	0,99	1,04	0,17	0,997	3,46	0,966	1,95
	10 ²	0,09	1,00	1,01	0,08	0,996	6,56	0,827	3,73
	10 ³	0,07	1,00	1,01	0,09	0,994	6,00	0,837	3,44
	10 ⁶	0,05	1,00	1,01	0,14	0,991	5,43	0,833	3,07
<i>Rhodotorula glutinis</i> CECT 10145	1	0,23	0,99	1,05	0,19	0,997	1,82	0,992	1,02
	10 ²	0,10	1,00	1,02	0,07	0,997	4,31	0,910	2,50
	10 ³	0,05	1,00	1,01	0,12	0,988	4,31	0,897	2,36
	10 ⁶	0,06	1,00	1,01	0,05	0,997	4,39	0,909	2,62
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> Bch	1	0,11	1,00	1,08	0,03	0,991	0,24	0,994	0,20
	10 ²	0,04	1,00	1,01	0,04	0,994	1,38	0,971	0,93
	10 ³	0,04	1,00	1,01	0,02	0,999	0,94	0,977	0,47
	10 ⁶	0,03	1,00	1,00	0,04	0,995	1,24	0,931	0,67

N_0 : inóculo inicial aproximado.

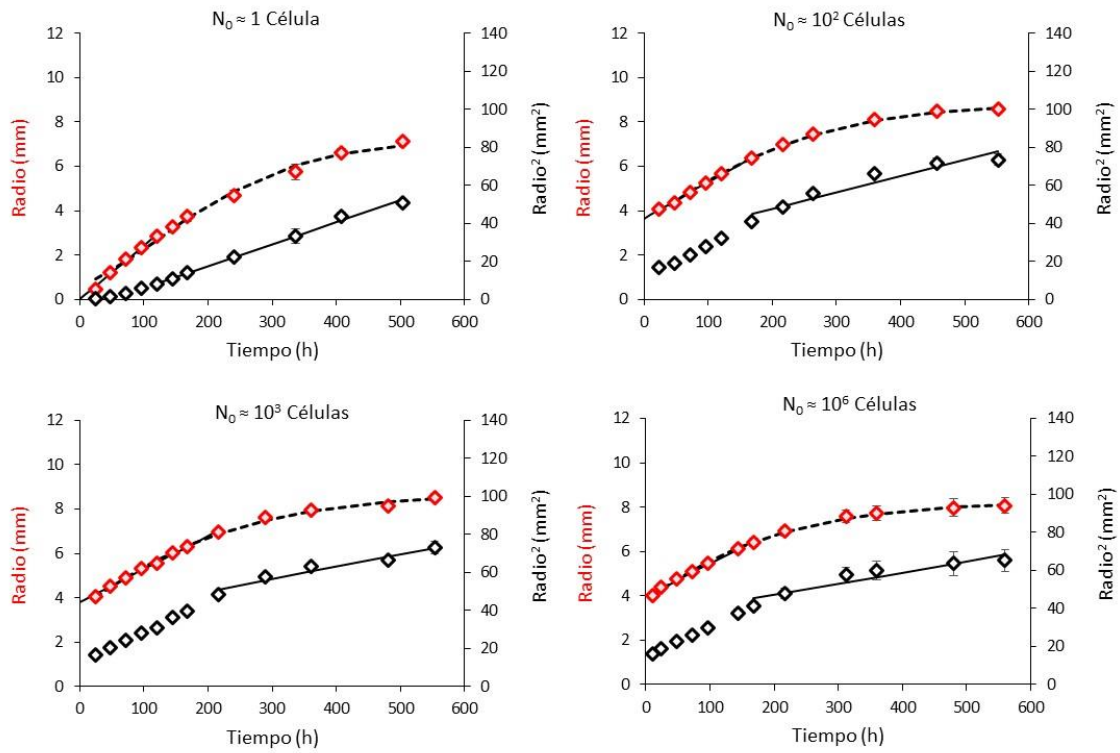
Combinación indica el valor RMSE del modelo en dos fases que incluye la “ley de crecimiento lineal del radio” y la “Ley de crecimiento del área”.

Bias: *Bias Factor* o factor de sesgo; Acc.: *Accuracy Factor* o factor de exactitud.

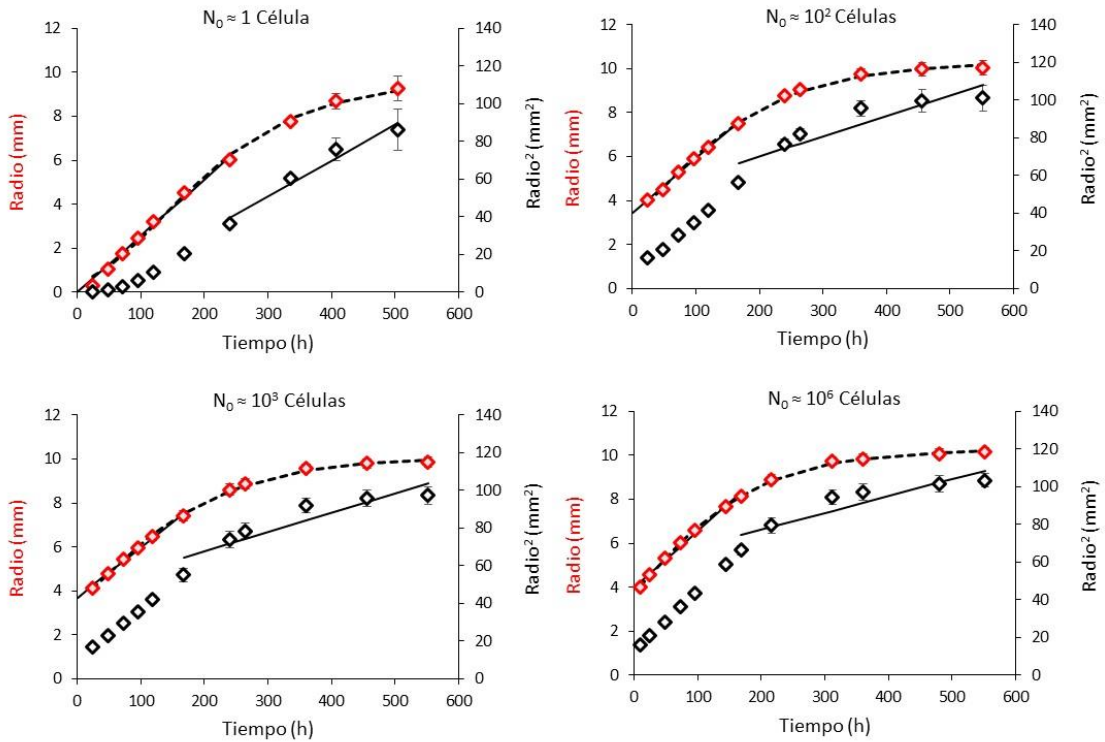
En la Tabla 8 aparecen los valores de RMSE obtenidos para cada modelo, así como el valor R^2 para los modelos lineales, y también para el modelo combinado lineal (modelo lineal del radio más modelo lineal del área o cuadrado del radio). Atendiendo a estos valores y a las representaciones en la Figura 10, el modelo que mejor se ajusta al crecimiento, solo durante los primeros datos de radio de las colonias de todas las especies e inóculos, es la “Ley de crecimiento lineal del radio” (línea continua en Figura 10 para el radio) ya que presenta los valores más bajos de RMSE y valores de R^2 muy cercanos a 1. Esto indica que el crecimiento de las colonias durante los primeros 7-10 días podría interpretarse como lineal. No ocurre lo mismo con la “Ley de crecimiento del área” (Tabla 8) porque se observa claramente en la Figura 10 como no existe una linealidad de los últimos valores del cuadrado del radio y más aún cuando se está acercando a su radio máximo. La única excepción pueden ser las colonias originadas por aproximadamente 1 célula para todas las especies y también para las colonias de *Z. rouxii* originadas por cualquier inóculo.

La combinación de los dos modelos de crecimiento lineales (en primer lugar del radio y en segundo lugar del radio al cuadrado) para describir a lo largo del tiempo el crecimiento de colonias, arroja los mismos resultados que anteriormente para el radio al cuadrado por separado. En contraste con estos modelos lineales combinados, el modelo sigmoide de Gompertz aplicado al radio (línea discontinua en Figura 10) se ajusta muy bien al crecimiento de éste a lo largo de todo el tiempo porque en ningún caso los valores de RMSE superan los 0,25 puntos, lo que indica que el crecimiento del radio de las colonias a lo largo del tiempo se puede describir con una cinética sigmoide. Nótese que los valores más altos de RMSE (peor ajuste) siempre se dan en las colonias de inóculos aproximadamente 1 célula como consecuencia del bajo ajuste de los primeros datos de radio a dicho modelo (Figura 10). Aun así, si se analiza el crecimiento de colonias de levaduras durante más de una semana, el modelo de Gompertz se decanta como el más idóneo.

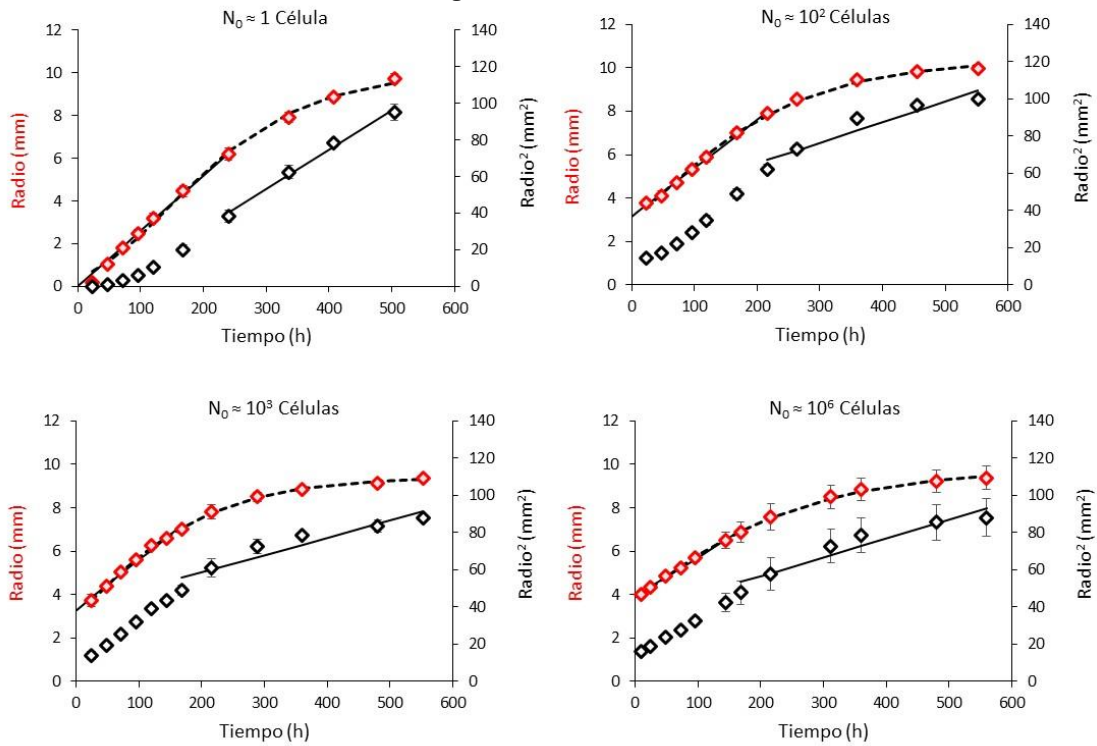
***S. cerevisiae* ATCC 7754**



***D. fabryi* PR66**



R. glutinis CECT 10145



Z. rouxii Bch

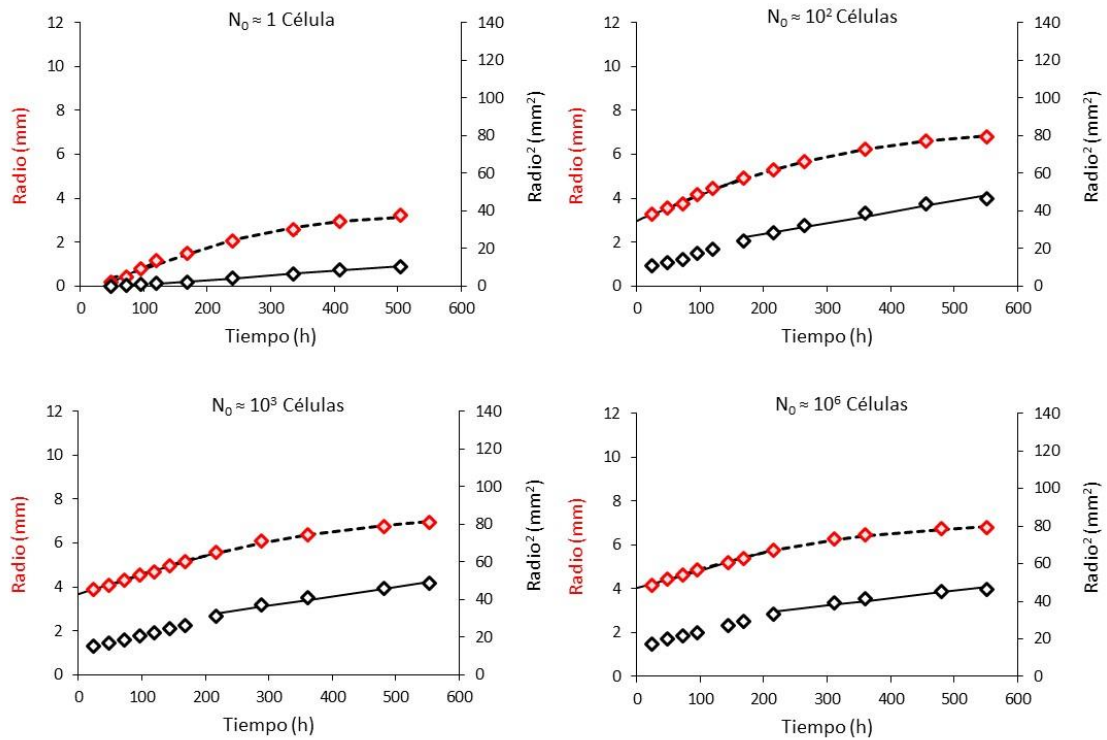


Figura 10. Aumento del radio colonial (rombos rojos) junto con el aumento del cuadrado del radio (rombos negros) a lo largo del tiempo de los distintos inóculos iniciales. Medias y desviación estándar de tres colonias en cada tiempo. La línea discontinua indica el ajuste por la ecuación de Gompertz del radio y las líneas continuas por la “ley de crecimiento lineal del radio” en los datos del radio, y posterior “ley de crecimiento del área” en los datos del cuadrado del radio.

3.2 Área

Los valores de área obtenidos en los diferentes tiempos durante el crecimiento de las colonias de levadura fueron modelados con el modelo de Gompertz adaptado (Ecuación 5). La representación de las curvas y los valores estimados de los parámetros de A_{max} y μ_i para todos

Tabla 9. Parámetros \pm error estándar del modelo de Gompertz de crecimiento del área colonial, junto con sus ajustes.

Cepa	$\approx N_0$	Gompertz				
		A_{max}	μ_i (área)	RMSE	Bias	Acc.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	1	204,88 \pm 11,23	0,0053 \pm 0,0003	2,77	1,07	1,12
	10 ²	243,81 \pm 4,36	0,0067 \pm 0,0003	2,67	0,98	1,02
	10 ³	231,00 \pm 7,08	0,0064 \pm 0,0003	3,33	1,01	1,02
	10 ⁶	230,31 \pm 10,45	0,0069 \pm 0,0005	2,51	1,00	1,01
<i>Debaryomyces fabryi</i> PR66	1	354,05 \pm 40,92	0,0066 \pm 0,0004	2,42	1,10	1,13
	10 ²	327,43 \pm 16,80	0,0085 \pm 0,0004	3,39	0,98	1,03
	10 ³	320,98 \pm 11,82	0,0081 \pm 0,0007	3,59	1,00	1,02
	10 ⁶	328,25 \pm 9,95	0,0091 \pm 0,0002	2,91	1,00	1,01
<i>Rhodotorula glutinis</i> CECT 10145	1	343,06 \pm 21,92	0,0067 \pm 0,0008	3,09	1,12	1,15
	10 ²	325,92 \pm 4,34	0,0075 \pm 0,0002	3,61	0,99	1,03
	10 ³	278,19 \pm 2,25	0,0077 \pm 0,0001	3,76	1,00	1,02
	10 ⁶	298,14 \pm 30,60	0,0074 \pm 0,0003	3,85	0,99	1,03
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> Bch	1	47,46 \pm 10,15	0,0059 \pm 0,0002	0,81	0,99	1,09
	10 ²	164,15 \pm 3,16	0,0050 \pm 0,0001	1,12	1,00	1,02
	10 ³	175,18 \pm 7,37	0,0043 \pm 0,0002	1,36	1,00	1,01
	10 ⁶	159,16 \pm 8,25	0,0048 \pm 0,0001	1,20	1,00	1,01

N_0 : inóculo inicial aproximado.

Bias: *Bias Factor* o factor de sesgo; Acc.: *Accuracy Factor* o factor de exactitud.

los inóculos iniciales aparecen en la Figura 11 y Tabla 9. Como se puede apreciar en la Figura 11, el modelo de Gompertz describe de forma precisa el incremento del área en todos los casos. Los valores de RMSE obtenidos son más altos en general para las cepas que alcanzan mayores A_{max} y que llevan consigo mayores errores estándar de dichos valores. En la Tabla 9 se ven que las colonias que alcanzan mayores A_{max} se corresponden a las pertenecientes a *D. fabryi* PR66 y *R.*

glutinis CECT 10145, en contraposición con la que menos crece, la levadura *Z. rouxii* Bch. Lo mismo ocurre con los valores de μ_i .

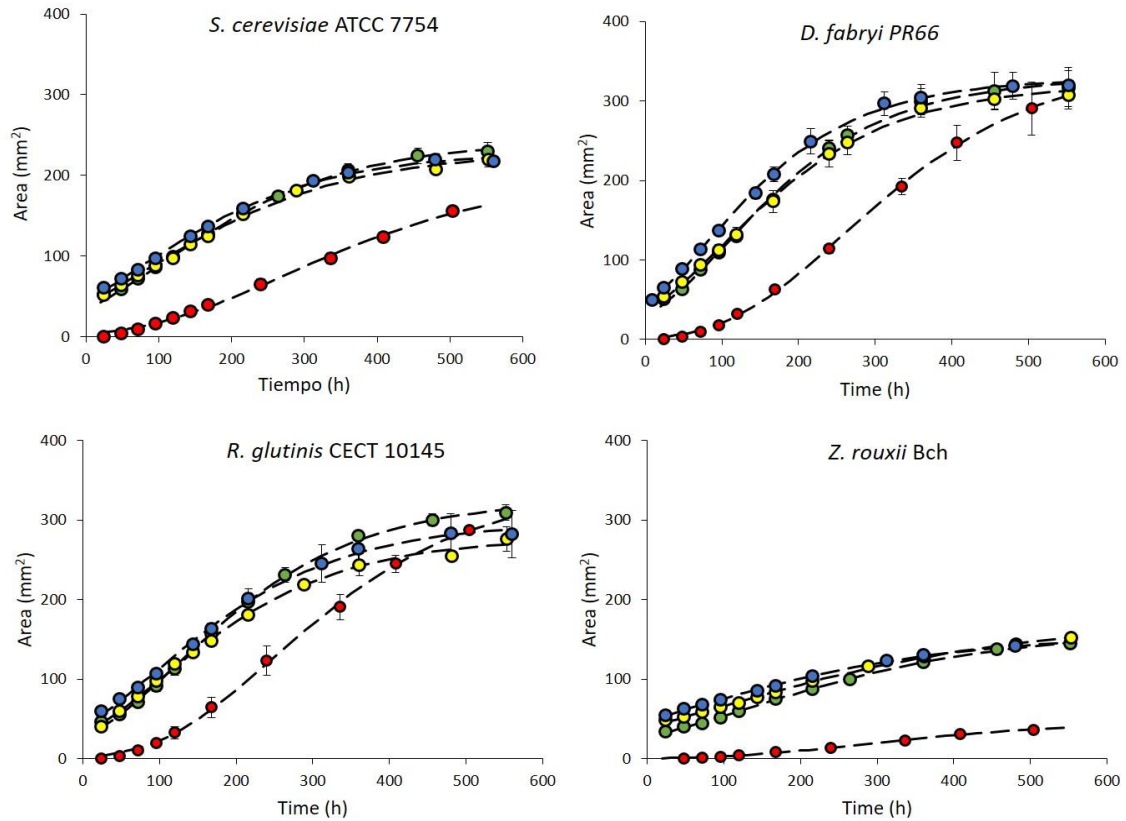


Figura 11. Cinética de crecimiento a lo largo del tiempo del área de las colonias originadas por cuatro inóculos (rojo, verde, amarillo y azul se corresponden con los inóculos de aproximadamente 1, 10², 10³ y 10⁶ células respectivamente) y para las cuatro cepas estudiadas. Medias y desviación estándar de tres colonias en cada tiempo. La línea discontinua indica el ajuste de la ecuación de Gompertz del área en cada caso.

En un crecimiento sigmoide se tiende a alcanzar un máximo, en este caso un área máxima, pero en ninguna de las cepas se cumplió que a mayores inóculos iniciales (rojo, verde, amarillo y azul se corresponden con los inóculos de aproximadamente 1, 10², 10³ y 10⁶ células respectivamente) se obtuvieran mayores áreas máximas por el ajuste por mínimos cuadrados con la aplicación Solver. Comparando el límite inferior y superior del 95 % de los valores A_{max} para todos los inóculos (Tabla 9) se vio que no existían diferencias significativas entre estos valores dentro de cada cepa, a excepción de las colonias más pequeñas de *Z. rouxii*. Con la μ_i ocurre lo mismo a excepción del inóculo más bajo de *S. cerevisiae* y *D. fabryi*. Adicionalmente se ha realizado una estimación de los valores de ambos parámetros para todos los inóculos de una misma especie mediante falta de ajuste aplicando *run test* y los resultados se muestran en la Tabla 10 junto con

sus límites inferior y superior. Los P-valor de la misma indican que no hay una pérdida de ajuste significativa usando esos parámetros comunes y que por tanto esas medias podrían ser iguales para cada inóculo dentro de la misma especie.

Tabla 10. Valores comunes de los parámetros cinéticos de la ecuación de Gompertz para el área (Ecuación 5) de cada especie. Calculados por la pérdida de ajuste empleando *Run test* (Bradley, 1968). Los P-valor muestran que no hay una pérdida de ajuste significativa.

Cepa	A_{max}	Valor inferior 95%	Valor superior 95%	μ_i	Valor inferior 95%	Valor superior 95%	P-valor
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	233,16	227,52	238,81	0,0070	0,0065	0,0075	0,15
<i>Debaryomyces fabryi</i> PR66	326,20	319,37	333,02	0,0085	0,0080	0,0089	0,38
<i>Rhodotorula glutinis</i> CECT 10145	296,11	281,95	310,28	0,0075	0,0065	0,0085	0,36
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> Bch	159,59	154,46	164,72	0,0055	0,0048	0,0061	0,73

Por tanto, lo que parece ocurrir no solo es que la ecuación de Gompertz describe bien el incremento del área de las colonias, si no que en cada cepa, a igualdad de condiciones y a cualquier inóculo inicial de células, las colonias tienen una cinética de crecimiento común que puede ser descrita por la ecuación de Gompertz empleando los mismos valores de A_{max} y μ_i . Lo mismo debe ocurrir con el radio.

3.3 Validación: ajuste del modelo a los datos de Gray y Kirwan, (1974)

Para la realización de una validación externa del modelo de Gompertz utilizado, aprovechamos los datos del estudio de Gray y Kirwan de 1974. Este estudio contiene una tabla con los diámetros obtenidos durante el seguimiento del crecimiento de cuatro réplicas de colonias de levadura (no especifican qué especie es) creciendo en placas de 9 cm de diámetro en un medio con glucosa como fuente de carbono y solidificado con agar. A su vez, también se han utilizado otros datos del mismo en referencia al crecimiento de diámetro de colonias en placas Petri de distintos diámetros pero con el mismo grosor de medio. A partir de estos datos de radio y los respectivos valores de área asumiendo colonias circulares (πr^2), se han aplicado las ecuaciones de Gompertz para el radio y el área propuestas (Ecuaciones 5 y 6) y se ha realizado una representación de dichos modelos y una estimación de los parámetros más adecuados en cada muestra (Figura 12, Tabla 11).

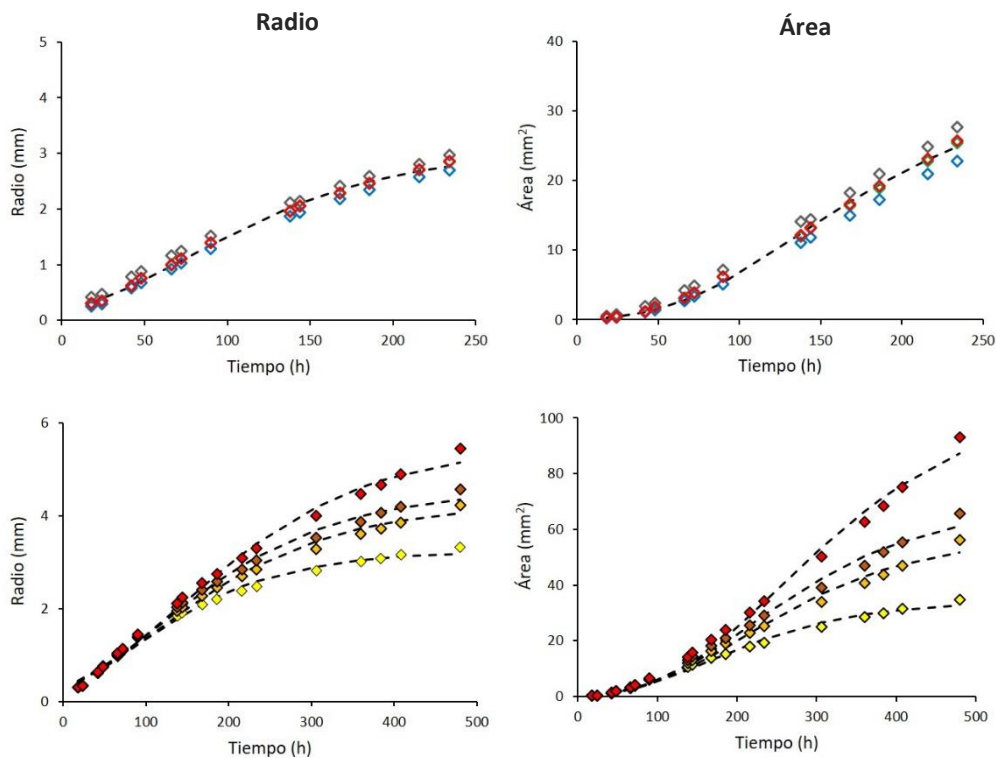


Figura 12. Validación de los modelos de Gompertz de crecimiento del radio y área con los datos de Gray y Kirwan, (1974). Gráficas superiores: cuatro réplicas (cada una en un color) de colonias creciendo en placas de 9 cm de diámetro. La línea negra discontinua muestra el ajuste de la ecuación de Gompertz para las cuatro réplicas. Gráficas inferiores: colonias creciendo en placas de distinto diámetro: 21 cm rojo, 12,5 cm marrón, 9 cm naranja y 5 cm amarillo. Las líneas negras discontinuas muestran el ajuste de la ecuación de Gompertz para cada caso.

Tabla 11. Ajuste del modelo de Gompertz de crecimiento del radio y área colonial aplicado a los datos de Gray y Kirwan, (1974).

Diámetro placa Petri (cm)	Gompertz Radio		Gompertz Área	
	Bias	Acc.	Bias	Acc.
9	0,99	1,03	0,94	1,09
5	1,01	1,06	1,01	1,13
9	1,00	1,07	0,96	1,16
12,5	1,01	1,06	0,97	1,15
21	1,00	1,07	0,93	1,19

Bias: *Bias Factor* o factor de sesgo; Acc.: *Accuracy Factor* o factor de exactitud.

En cuanto al modelo de Gompertz del crecimiento del radio, su aplicación con estos nuevos datos sigue demostrando que es un buen modelo para describir todo el crecimiento colonial con un sesgo inferior o superior respecto a los observados con una media de un 1 % y su inexactitud se sitúa de media entre un 3 y un 7 %. En lo referente al área, la bondad de

ajuste no es tan buena como para el radio ya que las estimaciones son mayoritariamente

inferiores a las observaciones con una diferencia media máxima de un 7 % y una inexactitud que varía entre un 9 a un 19 %, pero suficiente para validar el modelo.

4. Relación entre el número total de células de la colonia y su tamaño a lo largo del tiempo: el coeficiente superficie-celular, C_s

Tradicionalmente se asume que el incremento del tamaño de una colonia de microorganismos no móviles, como es el caso de las levaduras, depende del incremento de las células totales, de forma que cuando una célula se divide, su célula hija se acumula en sus alrededores, incrementando el volumen colonial, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V = \frac{Nt}{\rho(Nt)} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde V es el volumen de la colonia celular, Nt el número de células totales y $\rho(Nt)$ la densidad de las células totales en la colonia (células/mm³). A su vez, las colonias microbianas maduras pueden ser consideradas como cilindros de altura (h) constante (Pirt, 1967), desde el momento en el que la altura de la colonia no aumenta más. En levaduras creciendo en 10 g/l de glucosa se ha establecido que la altura máxima se alcanza a partir de 48 h aproximadamente (Kamath y Bungay, 1988). Consecuentemente, el número de células totales de la colonia estaría relacionado con el área (A) de la misma por la siguiente ecuación:

$$Nt = h \cdot \rho(Nt) \cdot A \quad \text{Ecuación 8}$$

Asumiendo que $\rho(Nt)$ es constante a lo largo de toda la colonia, la relación de Nt con el área se puede escribir como la ecuación 23:

$$Nt = C_s \cdot A \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde C_s es el parámetro que hemos llamado el coeficiente superficial o coeficiente superficie-celular (células/mm²), cuyo valor es equivalente a la altura de la colonia por su densidad celular.

En la Figura 13 aparecen representados las correlaciones entre el número de células totales/colonia y el área de las mismas a lo largo del tiempo para cada especie junto a los valores C_s para cada una de ellas. Se observa que, a pesar de incluir todas las colonias originadas a partir de todos los diferentes inóculos estudiados, existe una fuerte relación lineal entre el área y el número de células totales de las colonias. Esta proporcionalidad fue observada en las cuatro

especies estudiadas con valores de R^2 superiores a 0,95. Las colonias orinadas a partir de aproximadamente 1 célula (rombos en la Figura 13), son las que mejor se ajustan casi desde el principio (desde las 48 h) de su crecimiento a esta relación lineal en comparación con las procedentes de mayores inóculos.

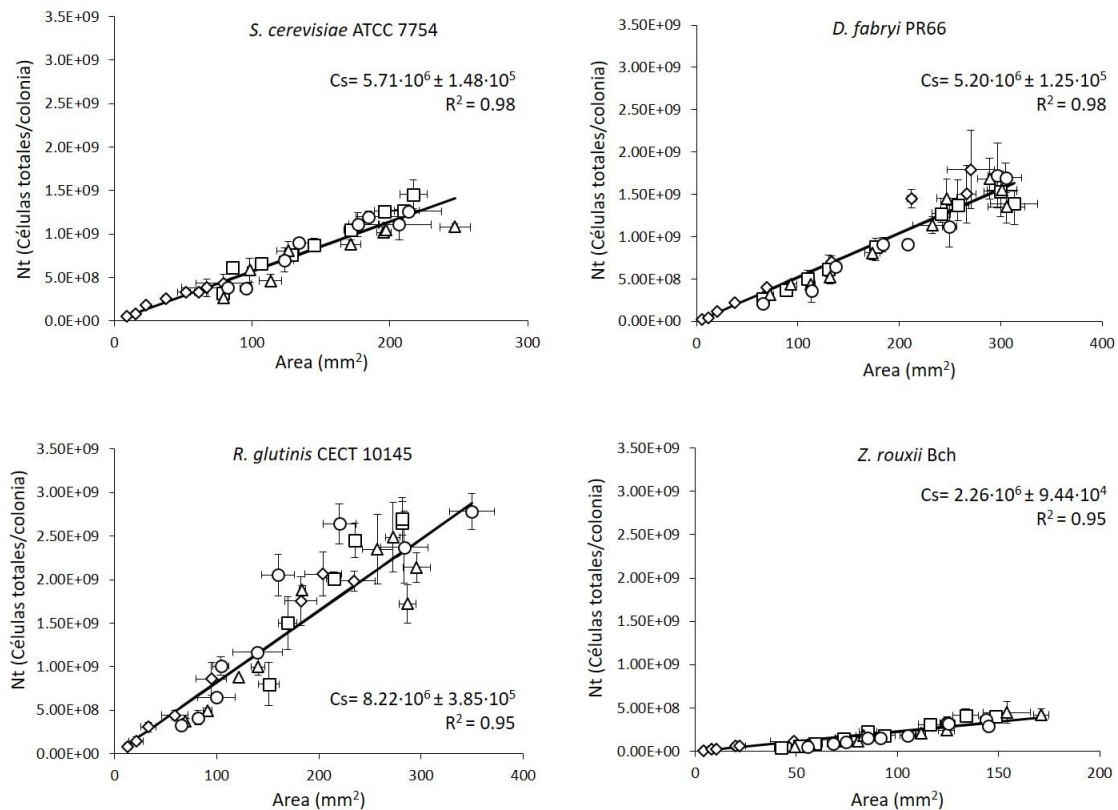


Figura 13. Correlación entre el número de células totales en la colonia con el área de la misma a través del parámetro C_s , realizada con colonias originadas por diferentes inóculos: aproximadamente 1 célula (rombos); 10^2 células (cuadrados); 10^3 células (triángulos); 10^6 células (círculos). Las barras de error horizontal y vertical indican la desviación estándar del área y del número de células totales de cada punto respectivamente.

De forma teórica, aunque no sean visibles las colonias, la línea de la relación parte de la ordenada en el origen igual a 0. La pendiente de la misma es el parámetro C_s , el cual indica la densidad celular por unidad de área de la colonia y tiene valores del orden de 10^6 para todas las especies siguiendo el orden de mayor a menor: *R. glutinis*, *D. fabryi*, *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*.

La ecuación de Gompertz para el área (Ecuación 5) se puede transformar en una ecuación logarítmica (Ecuación 10) para predecir el número de células totales en la colonia (N_t) a lo largo del tiempo empleando los valores de los parámetros comunes calculados para cada especie (Tabla 10) y multiplicando el área máxima por su correspondiente valor de C_s , al igual que el área

inicial a considerar en el tiempo t_0 y manteniendo la misma μ_i (Ecuación 11). Los valores predichos por este modelo se compararon con los experimentales $Ln(Nt)$ obtenidos de forma independiente. Al mismo tiempo, también se compararon estos mismos valores de Nt con los obtenidos de multiplicar su correspondiente valor de área por el parámetro de C_s . La comparación se recoge en la Tabla 12.

$$Ln(Nt) = Ln(Nt_{max}) - Ln\left(\frac{Nt_{max}}{Nt_0}\right) \cdot e^{-\mu_i(t-t_0)} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$A \cdot C_s = (A_{max} \cdot C_s) \cdot e^{-\left(Ln\left(\frac{A_{max} \cdot C_s}{A_0 \cdot C_s}\right) \cdot e^{-\mu_i(t-t_0)}\right)} \quad \text{Ecuación 11}$$

Tabla 12. Validación de: 1) las ecuaciones de $Ln(Nt)$ (Ecuación 10) obtenidas a partir de la ecuación del área de Gompertz utilizando los valores de los parámetros comunes calculados para cada especie (Tabla 10) y su correspondiente valor de C_s . 2) el valor de Nt obtenido al multiplicar el valor de área experimental ($A(Exp)$) por el correspondiente valor de C_s . Todos los valores de 1) $Ln(Nt)$ y 2) Nt , se compararon con los valores de Nt obtenidos experimentalmente de forma independiente.

Cepa	$Ln(Nt(Exp))$ Vs Ecuación de $Ln(Nt)$		$Nt(Exp)$ Vs $Nt = C_s \cdot A(Exp)$	
	Bias	Acc.	Bias	Acc.
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	1,011	1,013	1,093	1,260
<i>D. fabryi</i> PR66	1,004	1,009	1,053	1,176
<i>R. glutinis</i> CECT 10145	1,017	1,025	1,096	1,323
<i>Z. rouxii</i> Bch	1,012	1,021	1,160	1,350

Bias: *Bias Factor* o factor de sesgo; Acc.: *Accuracy Factor* o factor de exactitud.

$Nt(Exp)$ y $A(Exp)$ se corresponden a nuevos datos experimentales obtenidos tanto de células totales como de área respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 12, la comparación directa de los valores de Nt , muestra valores de sesgo y exactitud que indican que la utilización del área como medida del número de células totales pueden ser hasta un 35 % de inexactos en *Z. rouxii*, con observaciones excedidas entre un 5 y un 16 % respecto a los esperados por dicho método. Sin embargo, la logaritimización natural de los mismos hace que la comparación de valores observados de $Ln(Nt)$ y los predichos con la ecuación de Gompertz contengan factores de sesgo y exactitud muy cercanos a 1, indicando que el área es un método exacto y no sesgado para estimar el Ln del número de células totales en la colonia.

5. Análisis del crecimiento de colonias de levadura a distintos valores de pHs y en presencia de sorbato potásico

Inicialmente se comparó el crecimiento de tres especies de levadura creciendo en placas de YMA a los pHs de 7 y 5,6 con y sin sorbato potásico a 0,75 g/l.

Tabla 13. Parámetros \pm error estándar de los modelos que describen el crecimiento de colonias de diferentes levaduras creciendo con y sin sorbato potásico (SK) a pH 7 y 5,6. Para células viables Nv , μ_{exp} del modelo exponencial de la primera fase y μ_i y Nv_{max} del modelo de Gompertz de la segunda. Para el área el modelo de Gompertz con μ_i y A_{max} .

Cepa	pH	[SK] (g/l)	Nv							
			μ_{exp}		μ_i		Nv_{max}		Bias	Acc.
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	7	0	0,47 \pm 0,08	0,033 \pm 0,003	1,09 \cdot 10 ⁹ \pm 1,98 \cdot 10 ⁸	1,00	1,03			
		0,75	0,44 \pm 0,04	0,031 \pm 0,002	4,01 \cdot 10 ⁸ \pm 1,08 \cdot 10 ⁸	1,00	1,02			
	5,6	0	0,50 \pm 0,03	0,025 \pm 0,003	6,28 \cdot 10 ⁸ \pm 1,37 \cdot 10 ⁸	1,00	1,01			
		0,75	0,25 \pm 0,02	0,465 \pm 0,070	6,73 \cdot 10 ⁶ \pm 1,23 \cdot 10 ⁶	1,01	1,03			
<i>D. fabryi</i> PR66	7	0	0,51 \pm 0,01	0,038 \pm 0,003	2,95 \cdot 10 ⁸ \pm 9,66 \cdot 10 ⁷	1,00	1,01			
		0,75	0,44 \pm 0,02	0,038 \pm 0,005	3,77 \cdot 10 ⁸ \pm 1,78 \cdot 10 ⁸	1,00	1,02			
	5,6	0	0,45 \pm 0,05	0,046 \pm 0,005	1,81 \cdot 10 ⁸ \pm 9,51 \cdot 10 ⁷	0,99	1,03			
		0,75	0,22 \pm 0,03	0,029 \pm 0,004	2,41 \cdot 10 ⁸ \pm 7,78 \cdot 10 ⁷	1,00	1,02			
<i>Z. rouxii</i> Bch	7	0	0,17 \pm 0,02	0,028 \pm 0,004	3,11 \cdot 10 ⁷ \pm 1,34 \cdot 10 ⁷	1,00	1,03			
		0,75	0,13 \pm 0,01	0,016 \pm 0,003	1,23 \cdot 10 ⁷ \pm 3,81 \cdot 10 ⁶	1,00	1,04			
	5,6	0	0,17 \pm 0,02	0,053 \pm 0,003	1,26 \cdot 10 ⁷ \pm 1,06 \cdot 10 ⁷	1,00	1,03			
		0,75	0,03 \pm 0,00	0,013 \pm 0,003	1,63 \cdot 10 ⁶ \pm 7,57 \cdot 10 ⁵	1,00	1,02			
Cepa	pH	[SK] (g/l)	Área							
			μ_i		A_{max}		Bias	Acc.		
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	7	0	0,0071 \pm 0,0004	222 \pm 4,60	1,00	1,03				
		0,75	0,0054 \pm 0,0010	172 \pm 23,11	1,01	1,04				
	5,6	0	0,0060 \pm 0,0005	243 \pm 3,16	1,00	1,03				
		0,75	0,0335 \pm 0,0024	20 \pm 1,63	1,00	1,02				
<i>D. fabryi</i> PR66	7	0	0,0095 \pm 0,0010	279 \pm 3,28	0,99	1,03				
		0,75	0,0079 \pm 0,0013	272 \pm 4,17	1,00	1,04				
	5,6	0	0,0070 \pm 0,0011	297 \pm 10,52	0,99	1,03				
		0,75	0,0068 \pm 0,0002	295 \pm 14,68	1,00	1,05				
<i>Z. rouxii</i> Bch	7	0	0,0062 \pm 0,0009	141 \pm 9,56	1,00	1,04				
		0,75	0,0074 \pm 0,0006	67 \pm 3,14	1,02	1,09				
	5,6	0	0,0045 \pm 0,0008	158 \pm 3,40	1,00	1,01				
		0,75	0,0064 \pm 0,0004	38 \pm 3,25	1,00	1,00				

Bias: Bias Factor o factor de sesgo; Acc.: Accuracy Factor o factor de exactitud.

En referencia a la comparación de los valores de los parámetros de los modelos que rigen el crecimiento de células viables, en la Tabla 13 y la Figura 14, observamos que a pH 7 en ausencia o presencia de 0,75 g/l de sorbato potásico, la tasa específica de crecimiento en fase exponencial no se ve afectada, como ocurre en *S. cerevisiae*, o está muy ligeramente afectada como en las otras dos especies. En la fase Gompertz de crecimiento, el valor de μ_i es similar en presencia o ausencia de sorbato potásico a excepción de *Z. rouxii* y, para el valor de Nv_{max} , no hay diferencias en *D. fabryi* o es ligeramente inferior en *S. cerevisiae* o *Z. rouxii*. A pH 5,6, como el nivel de moléculas del conservante sin disociar aumenta hasta un 13 %, las diferencias en el crecimiento

se acentúan aún más en presencia de sorbato potásico tanto en μ_{exp} , disminuyendo hasta la mitad o hasta cinco veces menos como la cepa *Z. rouxii* Bch y prolongándose durante más tiempo, variando μ_i y disminuyendo uno o dos órdenes de magnitud Nv_{max} , a excepción de *D. fabryi*. Si se compara directamente los valores de Nv_{max} a los dos pHs en presencia de sorbato potásico se determina que *S. cerevisiae* es la especie en la que más disminuye la biomasa celular (hasta 60 veces menos) con el aumento del porcentaje de ácido disociado, seguido de *Z. rouxii* (7,5 veces) y *D. fabryi* a la que apenas afecta (1,5 veces).

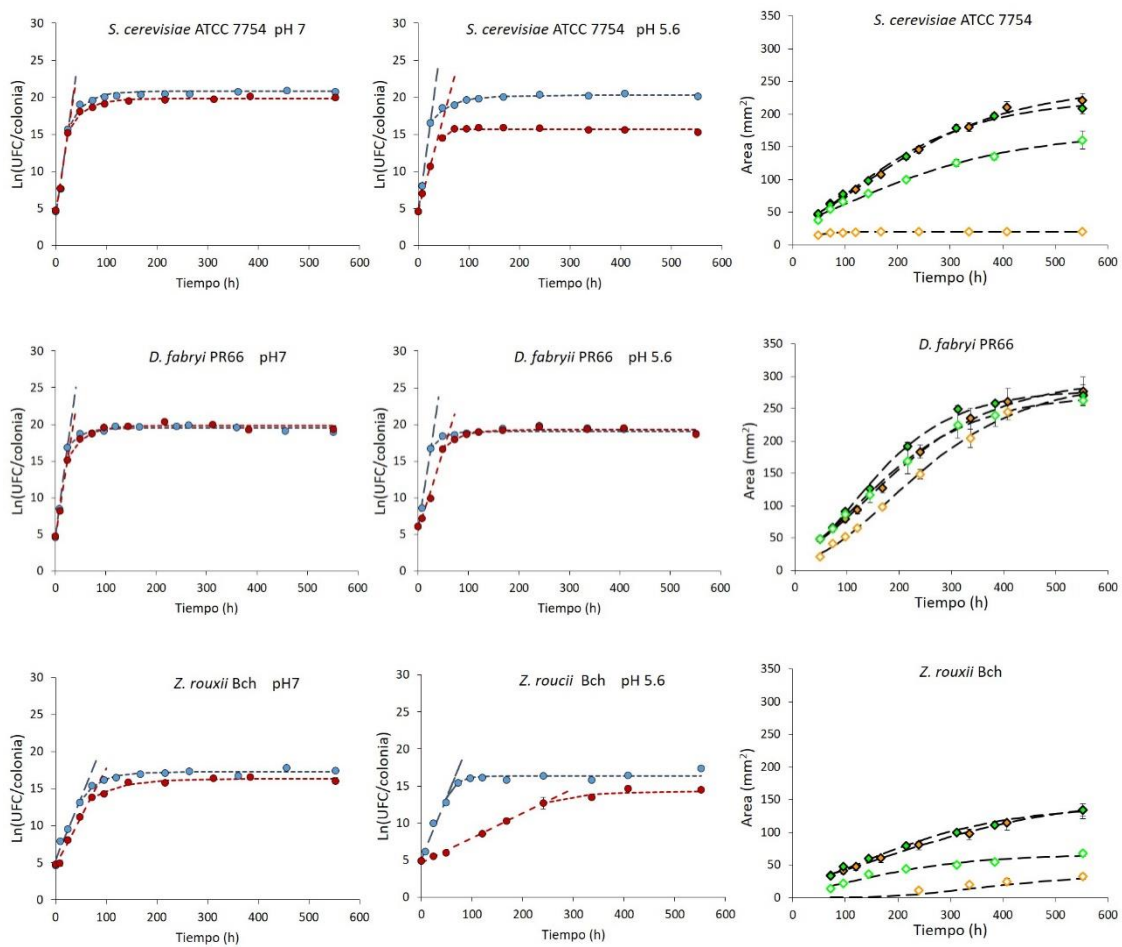


Figura 14. Comparación del crecimiento del Ln de las UFC/colonia a pH 7 (izquierda) y pH 5,6 (centro) sin (azul) y con 0,75 g/l de sorbato potásico (rojo). Las líneas discontinuas indican el ajuste exponencial de la primera fase y el ajuste por Gompertz posteriormente. En la gráfica de la derecha aparece representado el crecimiento del área de las colonias a lo largo del tiempo a pH 7 (verde), pH 5,6 (naranja), en ausencia de sorbato potásico (rombo relleno) o con 0,75 g/l (rombo vacío). Las líneas discontinuas indican el ajuste por Gompertz. Cada punto representa la media junto con la desviación estándar de tres colonias en cada tiempo.

Respecto el área de las colonias, lo más significativo que ocurre es la disminución de las áreas máximas si se compara la presencia y ausencia de sorbato potásico, especialmente a pH 5,6

donde en *S. cerevisiae* el área máxima disminuye 12 veces y en *Z. rouxii* 4 veces. Al igual que ocurría con Nv_{max} , *D. fabryi* alcanza áreas máximas similares en ausencia o con 0,75 g/l de sorbato potásico y a los dos pHs estudiados. Si se compara directamente los valores de Área máxima a los dos pHs en presencia de sorbato potásico se determina, al igual que con Nv_{max} , que *S. cerevisiae* es la especie en la que más disminuye la biomasa celular final (hasta casi 9 veces menos) con el aumento del porcentaje de ácido disociado, seguido de *Z. rouxii* (1,76 veces) y *D. fabryi* a la que no afecta.

Tabla 14. Parámetros \pm error estándar de los modelos que describen el crecimiento de colonias de otras cepas de levadura creciendo con y sin sorbato potásico (SK) a pH 5,6. Para células viables Nv , μ_{exp} del modelo exponencial de la primera fase y μ_i y Nv_{max} del modelo de Gompertz de la segunda. Para el área el modelo de Gompertz con μ_i y A_{max} .

Cepa	pH	[SK] (g/l)	Nv							
			μ_{exp}		μ_i		Nv_{max}		Bias	Acc.
<i>S. cerevisiae</i> EPD 1.1.2	5,6	0	0,41 \pm 0,04	0,027 \pm 0,004	5,13 \cdot 10 ⁸ \pm 1,38 \cdot 10 ⁸	1,00	1,02			
		0,75	0,18 \pm 0,01	0,020 \pm 0,004	3,18 \cdot 10 ⁶ \pm 4,30 \cdot 10 ⁵	1,00	1,02			
<i>D. hansenii</i> EPEC 1.3	5,6	0	0,39 \pm 0,04	0,015 \pm 0,003	9,05 \cdot 10 ⁷ \pm 4,61 \cdot 10 ⁷	1,00	1,03			
		0,75	0,14 \pm 0,02	0,050 \pm 0,002	7,17 \cdot 10 ⁷ \pm 3,28 \cdot 10 ⁷	1,02	1,07			
<i>D. hansenii</i> CBS 766	5,6	0	0,36 \pm 0,03	0,034 \pm 0,003	5,98 \cdot 10 ⁸ \pm 1,28 \cdot 10 ⁸	1,00	1,01			
		0,75	0,09 \pm 0,03	0,004 \pm 0,001	4,62 \cdot 10 ⁸ \pm 6,86 \cdot 10 ⁷	1,00	1,02			
<i>Z. rouxii</i> TYN 1.3	5,6	0	0,18 \pm 0,01	0,050 \pm 0,004	9,95 \cdot 10 ⁷ \pm 1,86 \cdot 10 ⁷	1,00	1,01			
		0,75	0,09 \pm 0,00	0,013 \pm 0,003	5,45 \cdot 10 ⁷ \pm 1,57 \cdot 10 ⁷	1,00	1,01			
Cepa	pH	[SK] (g/l)	Área							
			μ_i		A_{max}		Bias	Acc.		
<i>S. cerevisiae</i> EPD 1.1.2	5,6	0	0,0053 \pm 0,0002	208 \pm 3,98	1,00	1,02				
		0,75	0,0084 \pm 0,0005	26 \pm 0,82	1,00	1,01				
<i>D. hansenii</i> EPEC 1.3	5,6	0	0,0045 \pm 0,0002	254 \pm 8,12	1,00	1,04				
		0,75	0,0037 \pm 0,0002	221 \pm 12,58	0,97	1,04				
<i>D. hansenii</i> CBS 766	5,6	0	0,0091 \pm 0,0002	190 \pm 8,88	1,01	1,04				
		0,75	0,0020 \pm 0,0000	180 \pm 2,50	1,02	1,07				
<i>Z. rouxii</i> TYN 1.3	5,6	0	0,0030 \pm 0,0005	122 \pm 8,83	1,00	1,02				
		0,75	0,0100 \pm 0,0040	52 \pm 1,66	1,01	1,05				

Bias: Bias Factor o factor de sesgo; Acc.: Accuracy Factor o factor de exactitud.

A pH 5,6, donde las diferencias en el crecimiento en presencia y ausencia de sorbato potásico están más acentuadas que a pH 7, se ha estudiado también el crecimiento de otras especies de levaduras (Figura 15 y Tabla 14). De igual modo se cumple que, la presencia de 0,75 g/l de sorbato potásico hace disminuir hasta más de la mitad la μ_{exp} , varía μ_i , pero a excepción de la cepa de *S. cerevisiae* EPD 1.1.2 donde Nv_{max} disminuye dos órdenes de magnitud, en el resto de las cepas estudiadas la fase de transición del modelo de Gompertz se extiende hasta llegar a obtener valores de Nv_{max} muy similares o dentro del mismo orden de magnitud en ambas condiciones. En referencia al área, el modelo de Gompertz predice áreas alejadas de la obtenida en ausencia de sorbato, como ocho veces menos en *S. cerevisiae* EPD 1.1.2 y menos de dos veces en *Z. rouxii* TYN 1.3. Sin embargo, en las dos cepas de *D. hansenii*, a pesar de que en la Figura 15

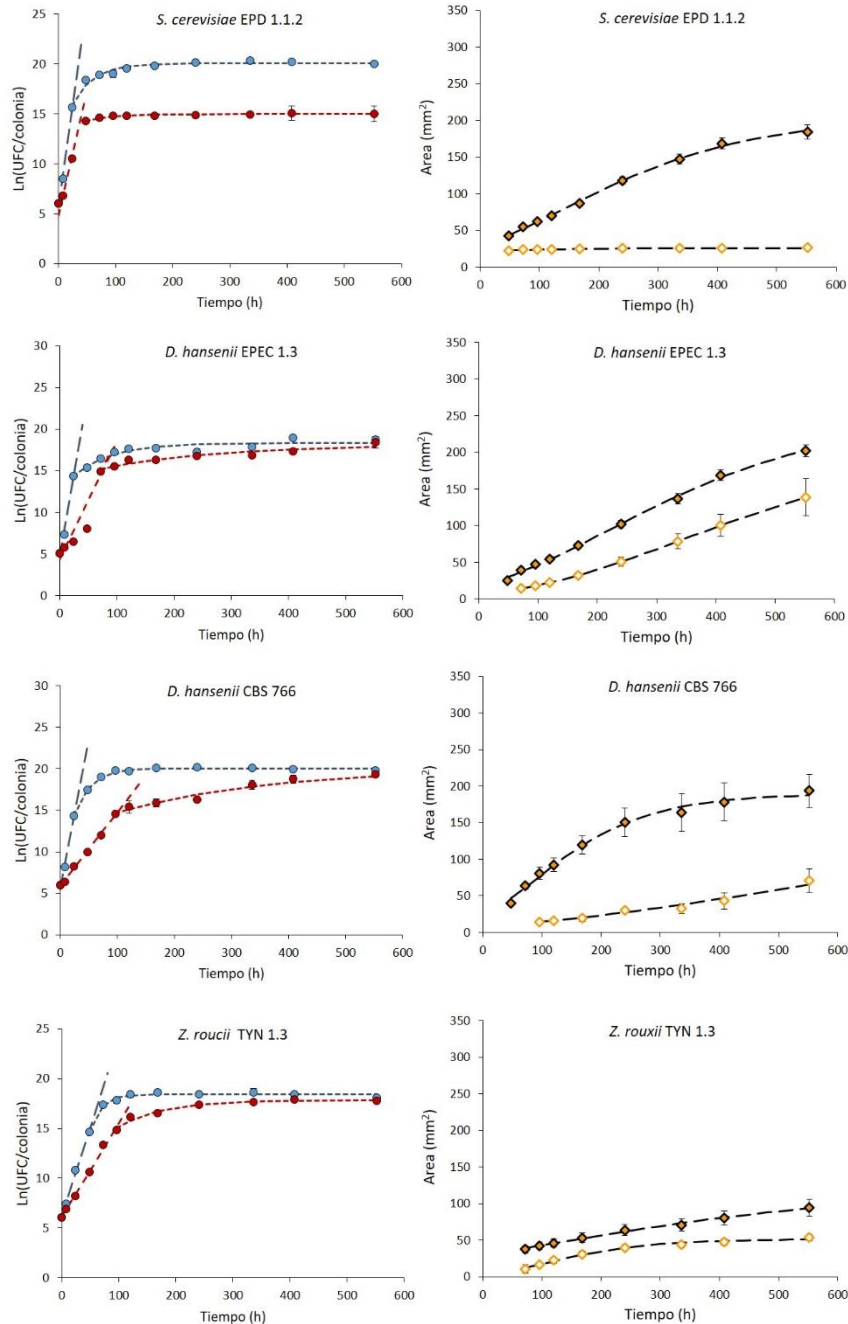


Figura 15. Comparación del crecimiento del Ln de las UFC/colonia a la izquierda a pH 5,6 sin (azul) y con 0,75 g/l de sorbato potásico (rojo). Las líneas discontinuas indican el ajuste exponencial de la primera fase y el ajuste por Gompertz posteriormente. En la derecha aparece representado el crecimiento del área de las colonias a lo largo del tiempo a pH 5,6 en ausencia de sorbato potásico (rombo relleno) o con 0,75 g/l (rombo vacío). Las líneas discontinuas indican el ajuste por Gompertz. Cada punto representa la media junto con la desviación estándar de tres colonias en cada tiempo.

al tiempo final de seguimiento hay diferencias claramente significativas en el área (casi 1,5 veces menos en *D. hansenii* EPEC 1.3 y 3 en *D. hansenii* CBS 766) el modelo de Gompertz predice que se alcanzarán áreas máximas próximas con y sin sorbato potásico (entre un 6 y un 15 % menos) pero con μ_i más bajas indicativo de una ralentización del alcance de dicha área máxima. Esto se

comprobó con el seguimiento durante más horas del crecimiento en área de estas cepas. Con estas nuevas cepas se reconfirma la tendencia de que la presencia de sorbato potásico afecta al crecimiento en forma de biomasa colonial de levaduras de acuerdo al siguiente orden: *Saccharomyces cerevisiae* > *Zygosaccharomyces rouxii* > *Debaryomyces*.

Tabla 15. Valores de $K_w \pm$ error típico en el crecimiento en medio sólido de todas las cepas estudiadas.

Cepa	K_w (mM)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	0,64 \pm 0,05
<i>S. cerevisiae</i> EPD 1.1.2	0,49 \pm 0,04
<i>D. hansenii</i> EPEC 1.3	0,35 \pm 0,03
<i>D. hansenii</i> CBS 766	0,21 \pm 0,04
<i>D. fabryi</i> PR66	0,63 \pm 0,03
<i>Z. rouxii</i> Bch	0,14 \pm 0,03
<i>Z. rouxii</i> TYN 1.3	0,63 \pm 0,04

Adicionalmente, se calcularon los valores obtenidos del parámetro K_w (concentración de ácido débil en la que la mitad de la tasa de consumo de sustrato se desvía al mantenimiento celular frente a estrés por estos ácidos) descrito por Quintas et al., (2005) en la ecuación simple que propone, pero aplicado para la influencia del sorbato en el crecimiento en medio sólido de cada una de las especies estudiadas. Estos valores aparecen en la Tabla

15, siendo más altos en las cepas de *S. cerevisiae*, *D. fabryi* PR66 y la cepa TYN 1.3 de *Z. rouxii* y más bajos en las cepas de *D. hansenii* y en la cepa Bch de *Z. rouxii*.

DISCUSIÓN

1. Comparación de la cinética de crecimiento celular en medio líquido y sólido

La mayoría de los modelos primarios descritos en la actualidad se aplican para describir el crecimiento microbiano en medios o alimentos líquidos. Sin embargo, aunque se han descrito modelos de formación y crecimiento del radio de las colonias, no existe ningún modelo de referencia a utilizar en el crecimiento microbiano de células viables en medios o alimentos sólidos. En los estudios realizados en medio sólido se tiende a analizar el crecimiento global de todas las células que crecen en él, crezcan o no en colonias, mediante homogenización, dilución y posterior recuento (Theys et al., 2008, 2009; Ding et al., 2010). Pero en este trabajo hemos analizado el crecimiento de las colonias de forma individual.

Hemos observado que existen similitudes y diferencias en la cinética de crecimiento de células viables en medio líquido y sobre la superficie de un sólido. La principal similitud es la primera fase común de crecimiento exponencial que ocurre en ambos medios durante las primeras horas, con tasas específicas de crecimiento constantes y similares. Esto ya se había observado en otros estudios con bacterias (McKay y Peters, 1995; Rodin y Panikov, 1995; Wimpenny et al. 1995a; Fujikawa y Morozumi, 2005) y con levaduras, al igual que la menor duración de esta fase con inóculos celulares iniciales mayores (Meunier y Choder, 1999). Por tanto, durante las primeras horas de crecimiento celular en la superficie de un medio sólido, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las células deben crecer casi planctónicamente como sobre una capa de agua en la superficie del medio (Stecchini et al., 2000). La tasa específica de crecimiento máxima y constante es similar a la de medio líquido para inóculos iniciales bajos. Esto no se cumple con inóculos de 10^6 células porque ya parten de una μ mucho más baja que en medio líquido. En colonias bacterianas se ha observado que comienzan a aparecer limitaciones en el crecimiento cuando estas alcanzan una población a partir de 10^5 UFC (Malakar et al., 2002, 2003; Kabanova et al., 2013) y en *S. cerevisiae* se sugiere que la fase exponencial de crecimiento continúa hasta de 10^7 células/colonia (Meunier y Choder, 1999). En las especies y condiciones que se estudian en esta Tesis, esa limitación debe aparecer al alcanzar valores de población cercanos a 10^6 células, tras la cual probablemente comiencen a producirse problemas de distribución de compuestos gaseosos, nutrientes y agua ya mencionadas en la introducción. Las distintas necesidades de oxígeno de las 4 especies, siendo *S. cerevisiae* puramente fermentativa, *Z. rouxii* y *D. hansenii* fermentativa-oxidativa y *R. glutinis* estrictamente oxidativa, adelantan

que, en base al mismo patrón de crecimiento observado en todas ellas, el oxígeno no sea un factor limitante en el crecimiento de las colonias. Postulamos que la distribución de los nutrientes o del agua deben ser los principales factores ya que al no crecer rodeado totalmente de medio como ocurre en sistemas líquidos, cualquier deficiencia o limitación de acceso de los mismos hacia algunas partes de la colonia se reflejará en la tasa y crecimiento global de la población. Por tanto, cuanto más restrictivas se vuelven las condiciones de crecimiento, el crecimiento de las colonias estará más alejado del crecimiento en medio líquido. Esto se corrobora con diversos estudios de colonias en los que se afirma que desde el principio de su crecimiento la μ de líquidos es mayor que la μ en sólidos. En esos estudios las condiciones desde el inicio del crecimiento ya eran restrictivas debido a, una mayor concentración de agente gelificante que restringe la movilidad de agua y nutrientes (Theys et al., 2008; Aspidou et al., 2014) y/o por la presencia de una elevada población inicial en la misma colonia o alta densidad colonial (Brocklehurst et al., 1997; Wilson et al., 2002; Theys et al., 2008; Aspidou et al., 2014).

A raíz de alcanzar dicha población limitante, la cinética de crecimiento de las colonias cambia y la tasa específica de crecimiento disminuye de forma exponencial hasta alcanzar valores cercanos a 0. Esta es la principal diferencia que ocurre respecto al medio líquido donde la μ pasa casi drásticamente de su valor máximo a 0. En colonias creciendo de forma sumergida en un medio gelificado, el hecho de estar rodeados de medio por todas las direcciones hace que la cinética de crecimiento tienda a parecerse más a la de un líquido pasando de la fase exponencial, a la fase estacionaria rápidamente y por tanto el modelo de Baranyi y Roberts sea el más idóneo en sus curvas de crecimiento (Theys et al., 2008, 2009). Generalmente se acepta que la tasa de crecimiento de los cultivos presenta el siguiente orden: líquidos>colonias sumergidas>colonias superficiales (Brocklehurst et al., 1997; Wilson et al., 2002).

La fase estacionaria de cultivos se define poblacionalmente como aquella etapa en la que no existe una variación neta del número de células viables por el alcance de un equilibrio entre las células que mueren y las que siguen duplicándose (Fuge y Werner-Washburne, 1997). Tanto en cultivo líquido como en sólido después de un tiempo (mayor en cultivos sólidos), el número de células viables alcanza un valor máximo y constante en medio líquido. En medio sólido, aunque sin una significancia estadística clara, las células viables también alcanzan un máximo o están creciendo a tasas muy cercanas a 0. Además, la cantidad de glucosa sigue disminuyendo y el tamaño de las colonias continúa aumentando, lo que conlleva a pensar que esas tasas próximas a 0 hacen que en las colonias siempre estén incorporándose nuevas células hasta que cuando se agoten los nutrientes, ni el área ni el número de células pueda seguir aumentando. Se asume

que las colonias de levaduras son ambientes heterogéneos donde las células vivas, que aportarían nueva biomasa o aumento del área, coexisten con células muertas o células apoptóticas y células en estado G_0 (Meunier y Choder, 1999; Váchová et al., 2012). En colonias de *S. cerevisiae* a los pocos días del inicio de su crecimiento se ha descrito que existe una expresión génica diferente entre las células del interior y del exterior de las mismas, que resulta en células externas más activas al expresar genes de fermentación, enzimas de biosíntesis de pared celular, marcadores de células en división; y células del interior más inactivas al expresar genes de estado estacionario y de degradación de pared celular entre muchos otros (Meunier y Choder, 1999; Mináriková et al., 2001; Traven et al., 2012). Por tanto, la colonia podría interpretarse como un ambiente muy heterogéneo donde la μ global de la misma estaría formada por la integración de las diferentes μ regionales dentro de ella (McKay et al., 1997).

La población máxima de células del sistema colonial en la fase estacionaria equivaldría a la *carrying capacity* que el sistema puede mantener (Brown y Rothery, 1994) e implica que a igualdad de condiciones y partiendo de cualquier inóculo, se alcanzará la misma población final máxima. Aunque hay una alta incertidumbre asociada a los datos de recuento celulares que obtuvimos, los valores de Nv_{max} predichos para el modelo de Gompertz también tenderían a esta característica dentro de cada especie, como ya se ha descrito que ocurre en el crecimiento colonial de *E. coli* (Fujikawa y Morozumi, 2005).

Para describir el crecimiento de las células viables en la colonia después de la fase exponencial, nos decantamos por el modelo de Gompertz porque tiene buenos ajustes, se adapta bien a la curva de cambio de fases y concuerda con la disminución exponencial de μ con respecto al tiempo detectada (Brown y Rothery, 1994). El uso más extendido del mismo ha sido para modelizar el crecimiento principalmente de bacterias, tanto en medio experimentales como directamente en alimentos, pero es poco aplicado en levaduras. El modelo de Hills y Wright (1994) utilizado en estudios de modelización del crecimiento bacteriano sobre la superficie de alimentos (Wright et al., 2000; Benedito et al., 2011) podría ser el modelo más parecido al de Gompertz para el crecimiento de células microbianas sobre superficies. Sin embargo, se basa en una función biexponencial de Gompertz más complicada y sus parámetros tienen un significado biológico menos claro. Nuestra combinación del modelo Exponencial-Gompertz podría suponer a su vez el primer modelo cuantitativo aplicado al crecimiento superficial de células viables en las colonias, al igual que el modelo cuantitativo que describe la dinámica de crecimiento de colonias bacterianas sumergidas descrito por Theys et al., (2009).

Analizando las cinéticas de crecimiento bifásica (Exponencial-Gompertz) en las cuatro especies de levaduras estudiadas, a pesar de sus diferencias filogenéticas y metabólicas, todas ellas muestran un patrón común en el crecimiento de las células viables en colonias y con un estrecho rango en los valores numéricos de sus parámetros. La única especie más excepcional, aunque mantiene el patrón bifásico, es la osmofílica *Z. rouxii* porque no crece bien en medio con alta actividad de agua y crece formando agrupaciones celulares o pseudofilamentos (Kurtzman et al., 2011).

En contraste con la mayoría de los trabajos en los que se analiza el crecimiento de células viables en colonia hasta 100 h aproximadamente con bacterias y cerca de 300 con levaduras, en este estudio el seguimiento se ha prolongado hasta casi 600 h, observándose que, las células viables de la colonia pasan la mayor parte de su vida creciendo muy despacio, a tasas hasta un 95 % más bajas que los cultivos líquidos en fase exponencial. De hecho, Kabanova et al., (2012) en su estudio de las colonias de *Lactococcus* destaca que más de los 2/3 de las células de la colonia se sintetizan después de la fase exponencial y en otros estudios se puntualiza que la supervivencia celular en medio sólido dentro de colonias de *S. cerevisiae* se prolonga durante mucho más tiempo que en medio líquido (Váchová y Palková 2005; Palková et al., 2009).

2. Análisis del crecimiento superficial de las colonias a lo largo del tiempo: radio y área

El recuento de viables en placa es una de las técnicas tradicionales invasivas más utilizadas, a pesar de ser laboriosa y lenta (Lobete et al., 2015). En este trabajo, la alta incertidumbre asociada a la medición del número de células, nos hizo hacer hincapié en establecer otro parámetro más fácilmente medible para evaluar de forma más precisa el crecimiento de levaduras en medio sólido. La medida del radio de las colonias es la técnica no invasiva más directa y simple que se emplea en hongos filamentosos para medir su crecimiento (Trinci, 1969; Koch, 1975; Marín et al., 2005, 2008). A partir de los estudios de Pirt, (1967, 1975) tanto en bacterias como en levaduras cada vez fueron más los estudios que empezaron a utilizar el radio de sus colonias como medida de su crecimiento.

Actualmente, existen innumerables programas informáticos que, con fotografías y técnicas de análisis de imagen, permiten calcular parámetros de interés de las colonias. Como no existe un programa universal y muchos no son de uso libre, se suele optar por el diseño de una aplicación o algoritmo propio. En este estudio hemos desarrollado un algoritmo de análisis de imagen con

el software MATLAB para la extracción de los parámetros de interés de las colonias. Este software también se ha empleado en otros estudios (Guillier et al., 2006; Memarian et al., 2007), ya que su *toolbox* de procesamiento de imágenes digitales integra a un conjunto de algoritmos y funciones de visualización, segmentación, transformación, análisis estadístico y medición de propiedades que te permiten realizar cualquier tipo de análisis de las mismas. Existen diversos métodos de segmentación de una imagen para distinguir los objetos de interés en ellas respecto del fondo, como la segmentación por borde o la segmentación Watershed, especialmente utilizada para separar células o colonias en imágenes de recuento (Robinson et al., 1998). Pero en la rutina denominada *mido_colonia* hemos utilizado el método de Otsu para eliminar la influencia de una iluminación no uniforme de las imágenes y para establecer un umbral de segmentación automático según el nivel de gris de cada una de ellas (Guillier et al., 2006). La utilización conjunta de ésta y el resto de rutinas diseñadas, no solo no aporta un error significativo en la medida del radio, sino que además, presenta ventajas en cuanto a velocidad, colonias a procesar y la posibilidad de obtener otros datos de interés con más precisión, sin considerar en muchos casos equívocamente, una forma circular perfecta de las colonias y sin haberse unificado las microcolonias iniciales.

El modelo cinético empleado tradicionalmente para describir el crecimiento del radio de las colonias, ha sido el modelo de Pirt, (1967, 1975). En nuestro trabajo con diferentes especies de levaduras también se corrobora la interpretación lineal del crecimiento del radio de este modelo. Sin embargo, añadimos dos matices a su aplicación. En primer lugar, que este modelo únicamente se cumple durante los primeros 7-10 días y es dentro de ese rango cuando los valores de Kr se pueden interpretar y utilizar como valores de tasa de crecimiento para comparar crecimientos en distintas condiciones o tratamientos (Salvesen y Vadstein, 2000; Stecchini et al., 2000). En medios con glicerol en vez de glucosa, la duración del crecimiento lineal del radio en *S. cerevisiae* aumenta hasta casi 30 días (Váchová y Palková, 2005) probablemente debido a una lentitud del crecimiento y procesos asociados al usar ese sustrato. En segundo lugar, que su uso combinado durante las siguientes horas con el modelo de crecimiento lineal del cuadrado del radio (Cooper et al., 1968) únicamente es válido en colonias pequeñas o en especies que crezcan mal bajo las condiciones a estudiar. Las colonias pequeñas todavía se encuentran en una fase de crecimiento lejana a alcanzar el crecimiento máximo y dicho modelo, el cual no recalca que las colonias paralizan su crecimiento en algún momento, es válido en ese periodo. En colonias de mayor tamaño o en un estado de crecimiento cercano al valor máximo que pueden alcanzar, dicho modelo presenta ajustes malos porque los datos se alejan de la linealidad.

La colonia tiende a alcanzar un tamaño superficial máximo y por tanto, su crecimiento superficial también se puede interpretar a través de un modelo sigmoide. La aplicación del modelo de Gompertz para el crecimiento del radio posee la ventaja de que con una única ecuación se puede describir su crecimiento durante todo el periodo de experimentación y con ajustes tan buenos como los del modelo lineal de Pirt. La forma de "S" de las curvas sigmoideas implica que en la primera parte de ella el tamaño aumenta hasta alcanzar en el punto de inflexión la tasa absoluta o poblacional de crecimiento máxima y posteriormente ésta disminuye hasta 0 a medida que se alcanza el tamaño máximo (Brown y Rothery, 1994; McKellar y Lu, 2004). La modelización del crecimiento microbiano con el modelo de Gompertz no contradice el modelo de Pirt, ya que durante la primera parte de esa curva sigmoidea se podrían interpretar los resultados de forma lineal. Sin embargo, la prolongación del tiempo de seguimiento hasta más de 500 horas puso de manifiesto que en tiempos superiores a 7-10 días, el crecimiento global se puede reinterpretar mejor usando un modelo sigmoide que lo abarque por completo. En un estudio previo también se destacó la no linealidad en el crecimiento del radio de colonias de algunas especies bacterianas al observarse K_r no constantes, desaceleraciones del crecimiento y curvas cóncavas o convexas en función del inóculo inicial (Panikov et al., 2002). Los modelos sigmoides se han utilizado para describir el crecimiento superficial microbiano en términos de radio/diámetro, especialmente en hongos filamentosos con la versión modificada de Zwietering et al., (1990) para el diámetro (Char et al. 2007; Marín et al., 2008; García et al., 2010; Zimmermann et al., 2011), pero pocas veces en bacterias o levaduras.

Basándonos *a priori* en la forma circular de las colonias y en la propiedad de la ecuación de Gompertz de que sus potencias siguen siendo también una ecuación de Gompertz, hemos empleado la misma ecuación del radio, pero para el análisis del crecimiento del área de las colonias (potencia 2 del radio) obtenido con las rutinas de análisis de imagen desarrolladas. La morfología de la colonia, incluyendo su circularidad o la irregularidad de sus bordes, depende de la interacción entre factores internos o genéticos y factores ambientales. Dentro de estos últimos, además de la fuente de carbono, la concentración de agar, el pH, el tamaño del inóculo (Granek y Magwene, 2010), la presencia de otras colonias cerca, la edad y la falta de nutrientes, son variables que también influyen (Palková et al., 1997; Gil de Prado et al., 2014). Mientras la medida del radio como una media entre dos diámetros perpendiculares va a depender de la circularidad de las colonias, la medida del área con programas informáticos es independiente de la forma que tengan. El uso de la ecuación de Gompertz para la descripción del crecimiento del área también obtuvo buenos ajustes (teniendo en cuenta que los valores de área al ser más altos que los de radio tienen valores de error también más elevados). Tanto μ_i como la A_{max} predicha

por el modelo en las especies estudiadas parecen depender del tipo de metabolismo que tengan y de si las condiciones son las adecuadas para su crecimiento o no. La primera condición se observa en que las especies más oxidativas al tener un metabolismo más eficiente energéticamente, tienen valores más altos de ambos parámetros (*D. fabryi* y *R. glutinis*) que las que tienen un metabolismo preferiblemente fermentativo (*S. cerevisiae* y *Z. rouxii*). La segunda condición se observa en el crecimiento *Z. rouxii* ya que su metabolismo preferiblemente fermentativo se suma a que crece sobre un medio no adecuado para ella en cantidad de glucosa (Kurtzman et al., 2011).

Previamente ya se han empleado modelos sigmoides como el logístico, para la descripción del crecimiento del área de colonias en *E. coli*, (Rattanabumrung et al., 2012) pero especialmente destacable es el uso del de Gompertz para detectar defectos durante el crecimiento de microcolonias mutantes en microplacas en base a cambios en los parámetros del modelo (Takeuchi et al. 2014). La primera parte de la curva sigmoide hasta el punto de inflexión se dice que es un proceso de estimulación del crecimiento (Molski y Konarski, 2003) y su forma podría interpretarse como un incremento exponencial, como se señala en el análisis del área de colonias gram positivas (Nithyaja et al., 2009). En otros estudios sin embargo, se indica que el crecimiento del área de colonias de *E. coli* hasta 24 horas de seguimiento es de forma lineal (Mertens et al., 2012) y si atendemos a su biomasa como medida proporcional al área, también aumenta de forma lineal hasta casi 20 días, en colonias de *S. cerevisiae* creciendo en medios respiratorios con glicerol (Váchová y Palková, 2005; Palková et al., 2009).

El área inicial de las colonias originadas por inóculos altos parte ya desde el principio de un área mayor, debido a la unificación de todas las microcolonias provenientes de cada célula. Este valor de área se alcanza por las colonias originadas por aproximadamente 1 célula al cabo de varios días. Esto indica que las colonias originadas por inóculos altos inician su crecimiento de forma avanzada, en términos de tamaño superficial, como si se tratara de un desplazamiento temporal (Shapiro y Hsu, 1989; Váchová et al., 2013). Consecuentemente, el aparente crecimiento ralentizado que tienen las colonias originadas por bajos inóculos hace que, en el tiempo de seguimiento de más de 500 h, todavía no hayan alcanzado el área máxima, mientras que las originadas por inóculos mayores la alcancen en menor tiempo. En estudios previos se ha observado que el área máxima que alcanzan las colonias depende de la especie, condiciones de cultivo y del número de colonias que hay en la placa siguiendo una relación inversamente proporcional e independiente de la posición. Esto último quiere decir, que bajo iguales condiciones de crecimiento, existe un valor constante de rendimiento de producción de biomasa

(biomasa producida/sustrato consumido) (Cooper et al., 1968; Chapuis et al., 1995; Gil de Prado et al., 2014). De acuerdo con ello, en este trabajo demostramos que, en las mismas condiciones, independientemente del inóculo inicial de células, las colonias tienen una cinética de crecimiento común que puede ser descrita por la ecuación de Gompertz empleando los mismos valores de A_{max} y μ_i sin observar una pérdida de ajuste significativa. Este hallazgo también confirma la hipótesis de que la tasa de crecimiento superficial, no parece estar afectada por el tamaño y forma del inóculo (Gray y Kirwan, 1974). Por tanto, las variaciones existentes de los parámetros para cada cepa de la Tabla 9 podrían deberse a errores experimentales o variaciones puntuales dentro del medio.

El área colonial máxima formada o la *carrying capacity* que dadas las condiciones del medio se ha podido producir (Brown y Rothery, 1994), se podría entender como al área proveniente de una única colonia o como el sumatorio total cuando hay más de una en la placa. Aunque se ha propuesto que la acumulación de concentraciones locales de productos de desecho, productos o inhibidores generados por su actividad metabólica pueden influir en el cese del crecimiento (Hochberg y Folkman, 1972; Wilson et al., 2002; Pipe y Grimson, 2008; Jeanson et al., 2015), el agotamiento de los nutrientes parece ser la principal causa de ello (Walter et al., 2011). Esto es lo que se observa en la Figura 7 y la Figura 11, donde a las 600 horas, la cantidad de glucosa es prácticamente 0 en las placas de cultivo con colonias de *S. cerevisiae*, tiempo en el que ya han llegado a alcanzar su área máxima predicha (233 mm²/colonia por 4 colonias/placa equivale a una capacidad máxima en *S. cerevisiae* de 932 mm² para 10 g/l de glucosa).

El modelo de Gompertz aplicado al radio y al área de las colonias queda validado a través de su aplicabilidad con los datos de levaduras del artículo de Gray y Kirwan de 1974. Para el radio se obtuvieron mejores ajustes que para el área. Esto es debido principalmente al mayor error que arrastra dicho parámetro, porque el área es πr^2 veces mayor que la medida del radio, y a que, este modelo se ajusta peor con colonias muy pequeñas o en los primeros tiempos de seguimiento. Sus datos de crecimiento en diferentes tamaños de placa se traducen en que a mayor tamaño de la misma hay una mayor cantidad de nutrientes y se obtiene un mayor radio o área máxima predicha y a su vez una menor velocidad (μ_i) a cual está disminuyendo la tasa específica de crecimiento del radio o del área.

No existen métodos de medida del número de células de la colonia que no impliquen la destrucción de las mismas. Sin embargo, se han descrito en bacterias varios tipos de ecuaciones que relacionan precisamente el logaritmo del número de células en la colonia con el logaritmo del área o el radio de las mismas (McKay y Peters, 1995; Harrison et al., 2000; Guillier et al.,

2006; Skandamis et al., 2007). Asumiendo una altura máxima y constante de las colonias de levaduras en torno a 1 mm (media por Kamath y Bungay en YPD con 10 g/l de glucosa) y una densidad constante ($5\text{-}8\cdot 10^6$ células/cm³), en este trabajo hemos demostrado por primera vez en colonias de levaduras una ecuación lineal que relaciona el área de las colonias con el número total de células, por medio del parámetro C_s . Al igual que los datos de células viables, el número total de células de una colonia son datos cuya validez está limitada por la alta incertidumbre asociada a los datos de recuento, lo cual explica los mayores índices de sesgo y exactitud en la comparación entre datos de Nt observados con los obtenidos a partir del área. Sin embargo, la logaritimización natural de los mismos (como en la mayoría de relaciones mencionadas), hace que la comparación de valores observados de $\ln(Nt)$ y los predichos a partir de su área con la ecuación de Gompertz para $\ln(Nt)$, contengan índices de sesgo y exactitud muy cercanos a 1, indicando que el área es un buen parámetro exacto y no sesgado para estimar el número de células totales en la colonia de forma directa y sin destrucción.

Comparando el valor de μ_i predicho por el modelo para las células totales por medio del área (Tabla 10) con el de células viables (Tabla 6), se observa que es mucho más pequeño el de las primeras que el de las segundas. Esa mayor velocidad de decremento de μ en células viables que en células totales probablemente se deba a los procesos de inactivación que estén ocurriendo dentro de las colonias. En la fase estacionaria de cultivos líquidos de *S. cerevisiae* conviven células quiescentes en estado G_0 y células no quiescentes con signos y marcadores de apoptosis (Allen et al., 2006; Herker et al., 2004). Los mismos marcadores aparecen en células creciendo dentro de colonias, pero a diferencia de medios líquidos, al cabo de unos días su presencia se restringe a células del centro colonial, permitiendo una apoptosis organizada y selectiva que libera nutrientes para que el resto de células sigan creciendo y sobrevivan (Váchová y Palková, 2005; Carmona-Gutiérrez et al., 2010; Váchová et al., 2012). También se ha demostrado el incremento a lo largo del tiempo de células viables no cultivables en colonias (Palková et al., 2009).

3. Propiedades relevantes de la ecuación de Gompertz en modelos del crecimiento de colonias de levaduras

El uso del modelo de Gompertz para modelar datos de crecimiento microbiano presenta varias ventajas. La primera, es que con una única ecuación se puede describir todo el crecimiento, previamente modelado por dos ecuaciones. La segunda, una propiedad del mismo relevante

para su elección en este estudio, es que sus potencias continúan siendo ecuaciones de Gompertz con los mismos parámetros. De esta forma la ecuación del radio se puede transformar en una ecuación para el área. La ecuación de Gompertz para el crecimiento del área de las colonias, aún a pesar de no tener éstas una forma circular perfecta, también arrojó resultados de ajuste muy buenos, como era de esperar, ya que el tamaño de la colonia depende del número de células que la componen, con independencia de la forma (Gil de Prado et al., 2014).

La ecuación original de Gompertz aplicada al número de células (no a su logaritmo) y al radio y área puede ser considerada como un modelo mecanístico (McKellar y Lu, 2004) porque todos sus parámetros tienen significado biológico. Los “parámetros máximos” de dichos modelos (Nv_{max} , Nt_{max} , A_{max} y r_{max}) estiman los valores máximos que se pueden alcanzar bajo las condiciones experimentales y, los “parámetros 0” (Nv_0 , Nt_0 , A_0 y r_0), la cantidad de células a partir de la cual comienza el crecimiento limitante o el primer tamaño colonial visible. El tercer parámetro μ_i mide la tasa a la que los factores limitantes del crecimiento están afectando a la μ . Cuanto mayor es su valor, más rápidamente decrece la tasa específica desde su valor máximo inicial, hasta valores cercanos a 0, provocados por limitaciones en el crecimiento que aparecen en las mismas. Este modelo y sus parámetros pueden ser una buena herramienta para evaluar de forma cuantitativa cambios en los tratamientos o condiciones de crecimiento, identificar factores limitantes en el crecimiento y sus efectos, o cuantificar el efecto de modificaciones genéticas. La forma sería analizar si se ven traducidos en cambios en el crecimiento final o la biomasa máxima (Nv_{max} , Nt_{max} , A_{max} y r_{max}), en la restricción del crecimiento con el tiempo μ_i , o en ambas.

4. Aplicación de los modelos de crecimiento de las colonias al crecimiento en presencia de sorbato potásico a diferentes pHs

Recapitulando lo descrito en los apartados anteriores, podemos resumir los resultados obtenidos en dos puntos especialmente relevantes para el desarrollo subsiguiente de esta Tesis: 1) hemos desarrollado un modelo matemático que describe con exactitud el crecimiento de levaduras sobre superficies sólidas cuyos parámetros tienen significado biológico y que permite su utilización para el análisis e interpretación de los efectos de condiciones ambientales sobre este tipo de crecimiento. 2) También hemos demostrado la correlación entre el área de una colonia y el tamaño de la población de células que la forman. Hemos comprobado que ambos puntos se

cumplen en las cuatro especies de levaduras analizadas, cubriendo un amplio rango de categorías taxonómicas y metabólicas. Por tanto, disponemos herramientas metodológicas, sólidamente validadas, que son: la medida cuantitativa del crecimiento de las colonias por análisis de imagen de sus áreas y su modelización en función de parámetros con significado biológico. En este último apartado de este capítulo hemos usado estas herramientas para estudiar el efecto del sorbato sobre el crecimiento de levaduras en medio sólido.

Los conservantes conocidos como sorbatos son agentes fungistáticos efectivos frente a un gran número de especies de géneros de levaduras y hongos, por lo que se añaden a gran variedad de alimentos (Stopforth et al., 2005). Se engloban dentro del grupo de ácidos débiles, los cuales tienen una mayor efectividad fungistática cuanto menor sea el pH del medio o alimento porque se favorece la presencia de la forma sin disociar capaz de entrar en el interior celular (Liewen y Marth, 1985). En este trabajo las condiciones de crecimiento de estudio han sido placas de YMA a pHs de 7 y 5,6 con y sin sorbato potásico a 0,75 g/l empleando cepas de los géneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces* y *Zygosaccharomyces*. Las razones de su elección han sido varias. *S. cerevisiae*, *D. fabryi*, *D. hansenii* y *Z. rouxii* son cepas que pertenecen a tres géneros frente a los cuales son efectivos dichos conservantes (Sofos y Busta, 1993). Sus cepas están implicadas en problemas de deterioro de alimentos como la producción de gas, crecimiento en superficie que ocurren en carnes, quesos, vegetales, productos de bollería y panadería, y también producción de malos olores y sabores que aparecen en algunos de ellos como por ejemplo el 1,3-pentadieno (Fleet, 2011). Entre los dos pHs elegidos, el más ácido 5,6 se encuentra próximo al valor de pH de la mayoría de carnes, pescados, productos de panadería y confitería y algunos productos lácteos. El pH neutro sirve de control ya que el valor de pK_a del sorbato a ese pH hace que se encuentre casi completamente disociado, por lo que no debería observarse inhibición. La concentración de sorbato potásico de 0,75 g/l entra dentro del rango de las usadas industrialmente y además, como comprobamos en un estudio previo (Fragoso, 2014), concentraciones mayores y a menores pHs inhiben excesivamente el crecimiento de levaduras dificultando la medida del crecimiento superficial del mismo.

Tradicionalmente se suelen hacer estudios de la concentración mínima inhibitoria de conservantes frente a levaduras en medio líquido por análisis de DO principalmente o determinaciones de la medida de las UFC/ml (El Halouat y Debevere, 1996; Stratford y Anslow, 1998) y extrapolarse esos resultados a lo que ocurre en alimentos o en medio sólido. La influencia de conservantes directamente en el crecimiento del diámetro superficial en medios sólidos o directamente sobre alimentos sólidos es una práctica que se ha realizado en estudios

con hongos (Marín et al., 2003; Char et al., 2007) pero no con levaduras. En este trabajo se ha intentado por primera vez analizarlo teniendo en cuenta los modelos de crecimiento desarrollados en medio sólido.

En esta Tesis hemos visto que la presencia de sorbato potásico afecta a la cinética de crecimiento en medio sólido de una forma similar, en algunos aspectos importantes, a la inhibición descrita en medio líquido. La primera característica común a señalar es la fuerte dependencia del pH. En medios sólidos como ocurre en los líquidos, cuando el pH externo es 7 no hay efecto inhibitor o este es muy pequeño, pero se observa un aumento de su efecto a pHs inferiores, lo que indica que la mayoría del efecto tóxico se produce cuando la forma no disociada entra en la célula. Existen otras hipótesis que han postulado otros autores para explicar el ligero efecto inhibitorio a pH 7, entre ellas que la forma disociada también podría presentar actividad antimicrobiana (Eklund, 1983; Burlini et al., 1993; Lück, 2011) y que el primer sitio de acción de los sorbatos pudiera estar en el exterior celular en la membrana plasmática (Stratford y Anslow, 1998; Stratford et al., 2009; Stratford et al., 2013a; Ter Beek et al., 2015).

De forma general e incentivada a menores valores de pH, la presencia de sorbato potásico afecta a la cinética de crecimiento del área de las colonias y a la cinética de crecimiento de las células viables. En estas últimas genera fases exponenciales más prolongadas y con valores de μ_{exp} más bajas, mismo efecto inicial que lo descrito en los cultivos líquidos (Quintas et al., 2005). Esta alteración de la forma de crecimiento suele estar acompañada en la mayoría de las cepas de cambios en la biomasa celular o rendimiento máximo de crecimiento, Nv_{max} y A_{max} , como también se había descrito previamente para el rendimiento en la fase exponencial de cultivos (Quintas et al., 2005). Se ha descrito que la presencia de sorbato potásico induce una serie de cambios que ocurren en el interior celular: acidificación del citoplasma que ocasiona una inhibición de varios sistemas enzimáticos celulares (Stopforth et al., 2005) y una acumulación interna del anión que podría influir en la producción de radicales libres llevando a la célula a un fuerte estrés oxidativo (Piper et al., 2001; Piper, 2011). Todos estos cambios podrían conllevar a una crisis energética celular porque la energía tendría que dividirse entre los procesos de defensa frente al estrés del ácido débil por un lado y el crecimiento y la división celular por otro (Leyva y Peinado, 2005; Quintas et al., 2005). Los cambios observados en el crecimiento de las colonias como la disminución en la tasa específica de crecimiento y en la biomasa o recuentos finales de crecimiento, se asemejan a las consecuencias directas de esa crisis energética celular que pueden provocar los ácidos débiles (Piper et al., 1997; Stratford y Anslow, 1996; Lambert y Stratford, 1999). Se ha descrito que la disminución de la tasa específica de crecimiento se debe

a que el rendimiento de producción de biomasa disminuye hiperbólicamente con el aumento del ácido débil disociado porque precisamente lo que aumenta con la concentración de ácido débil disociado es la tasa de mantenimiento invertida en defenderse (Quintas et al., 2005).

Tradicionalmente el hecho de observar diferencias en el tiempo de latencia o en μ_{exp} podría ser indicativo de que algún factor está alterando el crecimiento. Quintas et al., (2005), establecieron una ecuación simple en su estudio con ácidos débiles, en la que utiliza varias concentraciones de ácido sin disociar hasta un máximo de 0,3 g/l disociado y también emplea la tasa específica de crecimiento exponencial en ausencia y en presencia del ácido débil para estimar el parámetro K_w , indicador de la tolerancia de las especies al ácido débil. Atendiendo a dicho parámetro, *S. cerevisiae* y *D. fabryi* son las especies más tolerantes a sorbato potásico en medio sólido en las primeras fases de su crecimiento (crecimiento exponencial) y, al menos en *S. cerevisiae* su valor está próximo al descrito por Quintas en medio líquido. También según este parámetro, no todas las cepas de analizadas de *D. hansenii* y *Z. rouxii* tienen tolerancias similares, y los valores de *D. hansenii* son mayores que el descrito por Quintas en líquido, indicando que pueden crecer inicialmente mejor en medio sólido en presencia de conservantes. Los valores de K_w de *Z. rouxii* son muy inferiores a los descritos para *Z. bailii*, una de las especies más resistentes a ácidos débiles. Sin embargo, si atendemos a la determinación de los parámetros máximos del modelo, N_{Vmax} y A_{max} , los cuales estiman que *S. cerevisiae* es una de las menos tolerantes, en contraposición con K_w , nos permite establecer que aún a pesar de las diferencias en μ_{exp} , las células más resistentes pueden recuperarse y alcanzar, aunque más lentamente, valores de biomasa o recuentos finales similares o próximos a los obtenidos sin el factor o conservante, como ocurre en *Z. rouxii* TYN 1.3 y en cepas del género *Debaryomyces*. Podría estar ocurriendo como en cultivos de *Z. bailii*, en los que se ha descrito que las células más resistentes frente a ácidos débiles eran extremadamente raras en fase exponencial pero aumentaban hasta 8000 veces en fase estacionaria, de forma que sean éstas las que finalmente constituyan la población final (Stratford et al., 2014). Además, la propia estructura del medio hace que la distribución de los nutrientes, ácidos orgánicos, conservantes y otros compuestos hacia las células de la colonia sea diferente respecto en un medio líquido (Wilson et al., 2002) y por tanto, probablemente haya zonas de peor acceso, pero ventajoso para que las células puedan resistir inhibidores.

Si los resultados de tolerancia en medio sólido por μ exponencial no se corresponden en muchas cepas con los que se deducen de su crecimiento final máximo cerca de las 600 h, otras medidas diferentes de la tolerancia de un ácido débil descritas en la bibliografía como la concentración del ácido que inhibe el 50 % de la tasa de fermentación o el área bajo la curva de inhibición a

diferentes concentraciones (Ferreira et al., 1997; Arroyo-López, et al., 2008), podrían no ser comparables entre sí, si no se han hallado en los mismos tiempos de seguimiento del crecimiento.

Todos estos detalles apuntan a varias características: 1) El sorbato en medio sólido también induce como en líquido una caída de la μ_{exp} , 2) μ_{exp} no predice ni es indicativo del comportamiento final de la población según nuestros datos en medio sólido y 3) para analizar el comportamiento microbiano frente a un estrés y establecer términos de sensibilidad y tolerancia de una manera más adecuada a largos tiempos de vida útil de los alimentos, es necesario complementar el valor de μ_{exp} con valores de biomasa o rendimiento final de crecimiento.

Las variaciones en μ_i de la cinética de crecimiento del área cuando se comparan condiciones que aumenten el porcentaje de sorbato potásico disociado, podrían interpretarse como la resistencia de esa cepa al estrés y las restricciones que les provoca el conservante. Valores de μ_i más altos indican que la velocidad de crecimiento disminuye más rápidamente hasta hacerse 0 y se alcanza antes el crecimiento máximo por una mayor sensibilidad hacia la acción tóxica del conservante. Esto ocurre en cepas de *S. cerevisiae*. Por el contrario, valores más pequeños de μ_i en la comparación, indican que la velocidad de crecimiento disminuye más despacio y se alcanza más lentamente un crecimiento máximo que puede llegar a ser similar al obtenido en condiciones menos restrictivas y, por tanto, una mayor resistencia de la cepa hacia la acción tóxica del conservante. Esto último es lo que ocurre con las cepas de *Debaryomyces*.

S. cerevisiae y *Z. baillii* son dos de las especies en donde se han estudiado los principales mecanismos de resistencia de las levaduras a los conservantes: en *S. cerevisiae* por el estudio de las proteínas Pma1p y Pdr12p principalmente y la posible remodelación de la envoltura celular; y *Z. baillii*, catalogada como una de las especies más resistentes a ácidos, por la capacidad de utilizar los sorbatos como única fuente de carbono y la presencia de un pH intracelular más ácido (Mollapour y Piper, 2001a; Mollapour et al., 2004; Mira et al., 2010b; Piper et al., 2011; Stratford et al., 2013b; Stratford et al., 2014). El análisis conjunto de todos los parámetros de los modelos del crecimiento colonial de cepas de levaduras pone de manifiesto que, a pesar de ser una de las especies más estudiadas, *S. cerevisiae*, en las condiciones estudiadas, es la especie más sensible a la presencia de sorbato potásico en medio sólido y las cepas de *Debaryomyces* las más resistentes. Actualmente no existen trabajos en los que se estudie con detalle qué características tiene este último género para ser la especie menos sensible al ácido sórbico y los sorbatos.

Por último, destacar que los valores de sesgo (Bias) y exactitud (Acc.) que se indican en la Tabla 13 muy próximos a 1 la mayoría de ellos, e incluso con las nuevas cepas de *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y *Z. rouxii* empleadas (Tabla 14), consolidan que el modelo de crecimiento para células viables (Exponencial-Gompertz) y el modelo para el área (Gompertz) es un modelo no sesgado y exacto de aplicación en el crecimiento de colonias de levaduras bajo cualquier condición. Además, como sucede en el crecimiento del área de las cepas de *D. hansenii*, los parámetros del modelo de Gompertz también ayudan a predecir un posible mayor crecimiento posterior al tiempo de seguimiento.

Este estudio supone la primera vez que se analiza cómo afectan los conservantes a las cinéticas de crecimiento de microorganismos en medio sólido, tanto en células viables como al crecimiento del área, por lo que las conclusiones que podemos aportar necesitan de una amplitud mayor en el número de especies estudiadas para que se puedan considerar generales.

CAPÍTULO 2

Biología molecular de la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos por levaduras

INTRODUCCIÓN

Una vez estudiado el efecto de los sorbatos sobre el crecimiento de levaduras en medio sólido vamos a avanzar en la biología molecular de la producción del compuesto 1,3-pentadieno, una de las consecuencias de la interacción de levaduras y sorbatos en un mismo producto.

1. Microorganismos responsables de la producción de 1,3-pentadieno y alimentos donde se genera

Los alimentos y bebidas que contienen en su composición ácido sórbico o sus sales, pueden sufrir deterioro debido a la capacidad de algunos microorganismos de detoxificar el conservante generando el compuesto 1,3-pentadieno (Figura 1). Este compuesto volátil presenta un olor característico que recuerda a queroseno, plástico o hidrocarburo y, lógicamente, provoca el rechazo en los consumidores (Liewen y Marth, 1985; Sofos y Busta, 1993; Stopforth et al., 2005).

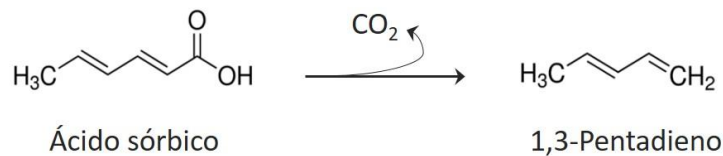


Figura 1. Conversión del ácido sórbico en 1,3-pentadieno.

El 1,3-pentadieno fue detectado por primera vez en el año 1966 por Marth et al., que observaron que varias especies del género *Penicillium* podían crecer fácilmente en los quesos porque eliminaban el ácido sórbico con que habían sido tratados. Este tipo de deterioro también se atribuyó a otras especies de hongos como *Aspergillus niger* o *Paecilomyces variotii* (Marth et al., 1966; Finol et al., 1982; Liewen y Marth, 1985; Sensidoni et al., 1994; Mann y Beuchat, 2008; Pinches y Apps, 2007). Como muestra la Tabla 1, la presencia de 1,3-pentadieno se ha detectado también en otros alimentos como por ejemplo, mermeladas, frutos secos o margarinas y bebidas como refrescos o sidras, donde los principales responsables de su aparición siguen siendo hongos filamentosos. En los años 90 se identificaron varias especies de levaduras productoras de 1,3-pentadieno. Entre ellas varias cepas de *D. hansenii* aisladas de quesos, margarina o mazapanes (Sensidoni et al., 1994; Casas et al., 1996) y *Z. rouxii* también de mazapanes (Casas et al., 1999, 2004). Sin embargo, en algunos estudios identifican el compuesto generado pero no el microorganismo responsable (Kindeler y Hatton, 1990; Pinches y Apps,

2007; Nieminen et al., 2008; Azhu Valappil et al., 2009; Gürbüz, 2011). O al contrario, se analiza la capacidad de producir este compuesto por ejemplo, en *S. cerevisiae* (Stratford et al., 2007), aunque no se han descrito alimentos con este tipo de deterioro debido a esta especie.

Tabla 1. Alimentos en los que se ha detectado la aparición de 1,3-pentadieno y microorganismos responsables.

Alimento	Microorganismo productor de 1,3-pentadieno	Referencias
Queso	<i>Penicillium</i> sp.: <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Paecilomyces variotii</i>	Marth et al., 1966 Sensidoni et al., 1994 Liewen y Marth, 1985 Finol et al., 1982 Mann y Beuchat, 2008 Pinches y Apps, 2007 Gürbüz, 2011
Margarina	<i>Trichoderma</i> sp., <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i>	Sensidoni et al., 1994 Pinches y Apps, 2007
Mermelada	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>Emericella</i> sp.	Nieminen et al., 2008
Nueces y avellanas	<i>Penicillium</i> sp.	Kindeler y Hatton, 1990
Productos de panadería	ND	Saxby, 1996 Gürbüz, 2011
Mazapán, galletas	<i>Z. rouxii</i> <i>D. hansenii</i>	Casas et al., 1996, 1999, 2004 Gürbüz, 2011
Refrescos, bebidas no carbonatadas y sidra	<i>Cephaloscyus fragrans</i> , <i>Trichoderma</i> sp.	Pinches y Apps, 2007 Mann y Beuchat, 2008 Azhu Valappil et al., 2009
Sopa instantánea	<i>Trichoderma</i> sp.	Pinches y Apps, 2007
Otros: Aceitunas en salmuera, miel, ensalada, soja	ND	Gürbüz, 2011

ND: no determinado

2. Sistema de descarboxilación

La Figura 1 muestra la estructura del ácido sórbico y del 1,3-pentadieno. Como puede verse, para convertir el primero en el segundo se requiere de la eliminación del grupo carboxilo, es decir, un único paso de descarboxilación. Stratford et al., en 2007 analizaron las 12 secuencias que codifican para enzimas descarboxilasas en *S. cerevisiae* concluyendo que la proteína

necesaria para la conversión del sórbico en pentadieno, Pad1p, está codificada por el gen *PAD1* (*Phenylacrylic Acid Decarboxylase*). El gen *PAD1* ya había sido estudiado anteriormente, aunque con el nombre de *POF1* (*Phenolic Off Flavor*), porque se descubrió su implicación en un estudio sobre la descarboxilación del ácido ferúlico en 4-vinilguaiacol (Figura 2) (Goodey y Tubb, 1982). Del mismo modo, se ha publicado que el ácido cumárico y el ácido cinámico son otros de los sustratos de la enzima Pad1p cuya descarboxilación origina 4-vinilfenol y estireno respectivamente (Figura 2) (Clausen et al., 1994). Los ácidos ferúlico, cumárico y cinámico pertenecen a un grupo de compuestos denominados ácidos fenilacrílicos o derivados de hidroxicinámico, presentes en las paredes celulares vegetales. Éstos son intermediarios de la vía fenilpropanoide de plantas superiores y poseen en general actividad antioxidante y antimicrobiana (Baranowski et al., 1980; Teixeira et al., 2013). Los fenoles volátiles que se generan de la descarboxilación de estos sustratos se denominan compuestos Pof (*Phenolic Off Flavours*) porque son los responsables de los malos olores y sabores detectados tanto en bebidas alcohólicas como vino, cerveza o sake, como no alcohólicas, por ejemplo en zumos de fruta (Thurston y Tubb, 1981; Shinohara et al., 2000; Vanbeneden et al., 2008; Schwarz et al., 2012).

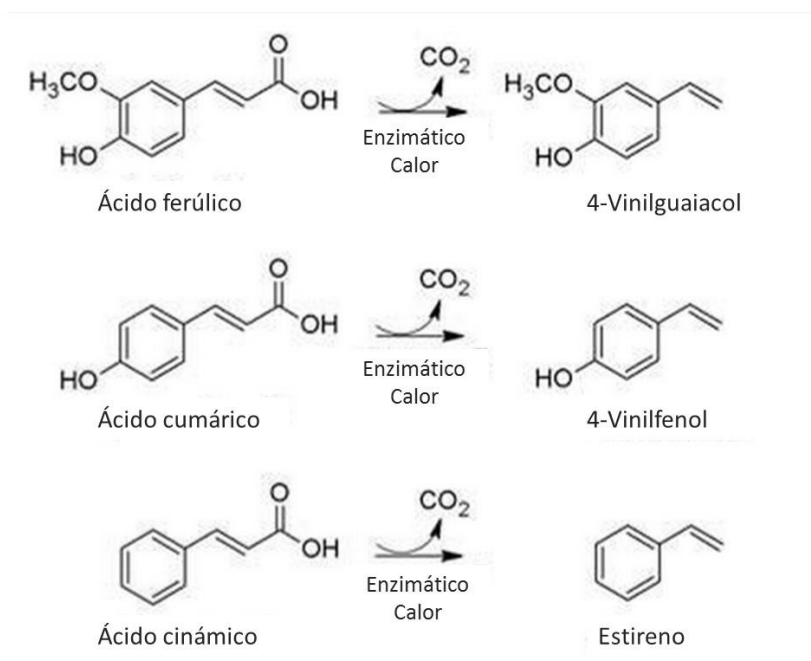


Figura 2. Estructura de los ácidos fenilacrílicos y sus correspondientes fenoles volátiles generados por tratamiento térmico de los productos o por el sistema enzimático de descarboxilación de diferentes microorganismos (Modificación de Schwarz et al., 2012).

Aunque la descarboxilación de los ácidos fenilacrílicos también se puede producir mediante el tratamiento térmico de los alimentos (Terpinc et al., 2011), la descarboxilación enzimática no oxidativa la realizan enzimas. Éstas se han descrito, por ejemplo, en levaduras de fermentación alta de la cerveza, del vino o deteriorantes del mismo como *Brettanomyces/Dekkera* y en bacterias como las enterobacterias o las bacterias del ácido láctico (Shinohara et al., 2000; Van Beek y Priest, 2000; Vanbeneden et al., 2008; Gu et al., 2011).

Los ácidos ferúlico, cumárico y cinámico son ácidos carboxílicos aromáticos cuya estructura se basa en un anillo aromático, un grupo alifático y un grupo carboxilo. El ácido sórbico no es considerado un ácido fenilacrílico, como los anteriores, al no tener un anillo aromático pero sí poseer una cadena alifática doblemente insaturada con un grupo carboxilo (Figura 1). Las características que tiene que presentar un compuesto para ser un sustrato del sistema Pad de descarboxilación son tres: poseer un grupo carboxilo, dos dobles enlaces, en el segundo y el cuarto carbono y, lo más importante, una longitud de cadena alifática entre 6,5 y 9 Å (Stratford et al., 2012). Esto explicaría por qué el sistema de descarboxilación acepta sustratos tanto aromáticos (Figura 2) como alifáticos (ácido sórbico) que cumplen esas características.

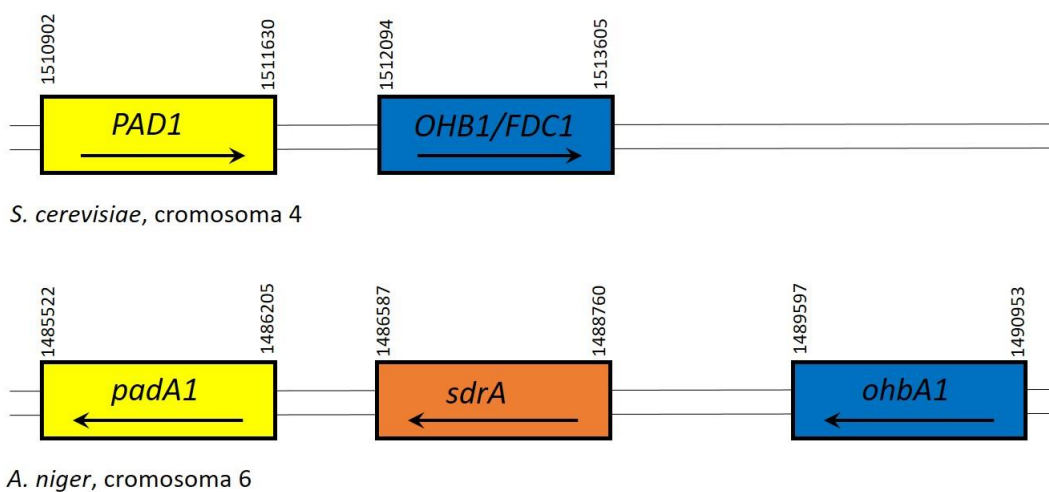


Figura 3. Genes descritos en *S. cerevisiae* y *A. niger* como necesarios para la descarboxilación de ácidos fenilacrílicos y su posición en los cromosomas 4 y 6 respectivamente. (Modificación de Plumridge et al., 2010).

Plumridge et al., (2008, 2010) descubrieron que la enzima Pad1p también es la responsable de la producción de 1,3-pentadieno en varias especies de *Aspergillus*. En *A. niger* el gen *PAD1* se encuentra integrado en un cluster de genes próximos en el cromosoma 6 (Figura 3) formado por: a) tres genes homólogos al gen de la descarboxilasa de *S. cerevisiae* *PAD1*, *padA1*, *padA2*,

padA3, los dos últimos sin función clara; b) el gen *ohbA1*, que codifica para una descarboxilasa de 4-hidroxybenzoico, con homólogos cerca de cada gen *padA* y c) el gen *sdrA* que es el factor que regula la transcripción de los dos genes anteriores. En *S. cerevisiae*, además del gen *PAD1* (número de acceso en el GenBank YDR538W), se ha descrito la presencia de un gen homólogo al *ohbA1* de *A. niger*, el gen *OHB1* o *FDC1* (*4-HydroxyBenzoic acid decarboxylase* o *Ferulic Acid Decarboxylase* con número de acceso en el GenBank YDR539W) situado a 500 pb del anterior en el cromosoma 4 (Mukai et al., 2010; Plumridge et al., 2010).

Desde los primeros estudios genéticos por Clausen et al., en 1994, siempre se había asociado la descarboxilación de los ácidos fenilacrilicos a la enzima Pad1p como única descarboxilasa (Stratford et al., 2007). Sin embargo, recientemente se ha descubierto en *S. cerevisiae* que los ácidos ferúlico, cumárico y cinámico se descarboxilan únicamente cuando se expresan tanto el gen *PAD1* como el *FDC1* (Mukai et al., 2010, 2014). Aún así, el papel que ejerce cada proteína en el proceso de descarboxilación no está claro.

Como hemos visto previamente, la base molecular de la producción de 1,3-pentadieno se ha estudiado mayoritariamente en hongos como *A. niger* y dentro de las levaduras, casi exclusivamente, en *S. cerevisiae*. Stratford et al., en 2007 encontraron *in silico* secuencias homólogas de la proteína Pad1p de *S. cerevisiae*, responsable de la producción de este compuesto, en el genoma de diversas levaduras ya secuenciadas. En ese estudio, se sugirió que *D. hansenii* sería capaz de descarboxilar sorbatos en 1,3-pentadieno ya que presentaba una región aminoacídica con un 60 % de identidad con la proteína Pad1p de *S. cerevisiae*; mientras que *Z. rouxii* no lo sería por carecer de dicha proteína. Esta afirmación no está de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con varias cepas de *Z. rouxi*, aisladas de mazapanes, en las que se constató en algunas de ellas la producción del compuesto volátil 1,3-pentadieno a partir de sorbato (Casas et al., 1996, 1999, 2004) y que permitió diseñar una prueba simplificada sensorial (Casas et al., 1999; Casas, 1999). Además, pone de manifiesto la necesidad de profundizar en las bases moleculares de la producción de 1,3-pentadieno, así como de aumentar el número de cepas a estudiar.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Estudio de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de levadura de diferentes especies

1.1 Microorganismos utilizados y métodos de conservación

En este trabajo se han utilizado cerca de 80 cepas de levaduras, 51 de *Debaryomyces hansenii*, 6 de *Debaryomyces fabryi*, 12 de *Zygosaccharomyces rouxii* y por último, 7 pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas empleadas provienen tanto de Colecciones de Cultivo Tipo como de aislamientos realizados en nuestro laboratorio a partir de alimentos que presentaba algún signo de deterioro. Algunas de estas cepas provienen de alimentos en los que se detectó la presencia de 1,3-pentadieno.

Las cepas se conservaron a -80°C en glicerol al 20 % (v/v) en tubos de crioconservación con partes iguales de glicerol al 40 % (v/v) e YMB (composición en la sección 1 de Material y Métodos del capítulo 1), al que se añadió un asa de biomasa de la cepa crecida durante 24-48 h en YMA (misma composición que YMB más 2 % (p/v) de agar). De forma rutinaria, se sembraron las cepas en placas o tubos con YMA para su utilización y tras su crecimiento se conservaron a 4°C.

1.2 Medios e inóculos empleados

Para detectar las cepas responsables de la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbato, se ha utilizado una modificación del método descrito por Casas et al., en 1996, 1999 y Casas, (1999), que consistía en inocular un medio general, el medio YMB, suplementado con sorbato potásico (Scharlau, Barcelona, España), a concentración y pH que no produzca la inhibición total del crecimiento de las levaduras. Se empleó una concentración de 0,75 g/l y dos pHs (5,6 y 7). Los ensayos se realizaron en tubos de 25 ml de volumen final con 9 ml del medio y tapón de rosca hermético. Como controles, se prepararon e inocularon de la misma forma tubos con medio sin sorbato potásico. Los tubos se inocularon con 1 ml de una suspensión 6 McFarland (10^8 células/ml) previamente recogida de un cultivo de 24 o 48 h en YMA. Se realizaron al menos dos réplicas de cada cepa. Una vez inoculados los tubos, se cerraron herméticamente y se incubaron a 28°C a 120 rpm durante más de 4 días.

1.3 Detección de 1,3-pentadieno

El 1,3-pentadieno es un compuesto muy volátil (punto de ebullición de 42°C y presión de vapor a 25°C de 53,3 KPa, ICSC 1722; CAS N°: 504-60-9) y como ya se ha mencionado anteriormente, tiene un olor desagradable a plástico, hidrocarburo o pintura fácilmente detectable a altas concentraciones. Una vez pasado el tiempo mínimo de incubación establecido para detectar bien el olor, se procedió a su detección en el espacio de cabeza de los cultivos de dos formas, como se detalla a continuación.

1.3.1 Detección sensorial

Se estableció un panel de expertos de tres personas, una de ellas entrenada durante años con este tipo de deterioro y que emitiría el veredicto final en caso de duda. El proceso consistió en la apertura y detección olfativa del compuesto volátil en las muestras incubadas con y sin sorbato, obteniéndose así una determinación rápida de si el olor de ambos era igual o diferente. Si el olor era diferente y la muestra con sorbato presentaba el olor característico del 1,3-pentadieno se procedía a catalogar esa cepa como productora de 1,3-pentadieno siempre y cuando se obtuvieran los mismos resultados con la otra réplica.

1.3.2 Detección por GC-MS

Se analizaron adicionalmente una selección de cepas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) con el fin de comparar la exactitud del análisis sensorial. Para esta técnica se usaron tubos de cromatografía de 20 ml de volumen con tapones de rosca magnéticos (LLG Labware, Meckenheim, Alemania), conteniendo 10 ml de volumen final de muestra de YMB siguiendo la misma metodología y condiciones que el apartado 1.2 para las muestras de levaduras y las muestras con 1,3-pentadieno puro (mezca de isómeros al 50 % Cis-Trans (Aldrich-Chemical, Wiscosin, Estados Unidos)) por duplicado.

Los análisis se realizaron en el Centro de Apoyo a la Investigación de Espectrometría de Masas de la Universidad Complutense de Madrid en un cromatógrafo de gases modelo Varian CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masas por trampa de iones modelo Saturno 2200 GC/MS/MS en modo automático, equipado con un inyector automático-CombiPal para extracción de 200 µl del espacio de cabeza con agitación. La inyección de la muestra en la columna fue de tipo splitless. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna capilar Phenomenex Zebrón-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 micras de espesor de película). El compuesto volátil se introdujo en un flujo de helio de alta pureza a 1,0 ml/min. La temperatura de la columna se

programó de la siguiente forma: 2 min a 30°C, 2°C/min hasta 40°C durante 7 minutos, 15°C/min hasta 100°C durante 11 minutos y finalmente 25°C/min hasta 200°C y mantenimiento a esta temperatura durante 5 min. La temperatura de inyección fue de 200°C y la temperatura de la interfase fue de 280°C. El espectrómetro operó en el modo de impacto electrónico (EI) dentro del rango de masas de 25 a 100 m/z y la energía de ionización fue de 70 eV. El espectro de masas se adquirió mediante la monitorización de iones característicos de la misma (SIM, *Selected Ion Monitoring*).

2. Estudio molecular de la producción de 1,3-pentadieno en las levaduras *D. hansenii* y *Z. rouxii*

2.1 Gen *PAD1*

Con objeto de identificar, en las especies *D. hansenii* y *Z. rouxii*, secuencias homólogas del gen *PAD1* de *S. cerevisiae* (N° de acceso en GenBank YDR538W), se realizó en primer lugar una comparación *in silico* de esta secuencia con el genoma secuenciado de ambas especies utilizando la herramienta BLASTn del NCBI (Camacho et al., 2008). Una vez localizadas se diseñaron cebadores específicos y se procedió al análisis de la secuencia en varias cepas de las dos especies y al estudio de expresión.

2.1.1 Análisis de la secuencia de gen *PAD1*

Para el análisis de las secuencias tanto en la especie *D. hansenii* (*DhPAD1*) como de *Z. rouxii* (*ZrPAD1*) en primer lugar se llevó a cabo la extracción del DNA a partir de colonias frescas de diferentes cepas empleando el método rápido descrito por Lööke et al., (2011). Para las reacciones de amplificación se han usado los cebadores diseñados que aparecen en la Tabla 2, los primeros de ellos previamente desarrollados en nuestro laboratorio para *D. hansenii* (Wrent et al., 2015b). En la reacción de PCR se utilizaron: 1,25 µl de cada cebador (20 mM), 12,5 µl de NZYtaq2x colourless Mastermix (NzyTech, Lisboa, Portugal), 50-100 ng de DNA y agua hasta completar un volumen de 25 µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y comprenden un primer ciclo de desnaturalización de 5 min a 30°C, seguido de 30 ciclos de amplificación. Cada ciclo contiene un paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min, 45 segundos a la temperatura de hibridación de los cebadores de las especies a estudiar y 45 segundos a 72°C para la elongación. Tras el último ciclo de amplificación se realizó una extensión final de 5 min a 72°C. Para asegurarnos de la correcta amplificación, 5

µl del producto de cada reacción de PCR junto con 0,5 µl de tampón de carga 10x (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) se corrieron en un gel de agarosa preparado al 1 % (p/v) (Bio-Rad Laboratories Inc., California, Estados Unidos) en tampón TAE y teñido con 0,05 % (v/v) de bromuro de Etidio (Bio-Rad Laboratories Inc., California, Estados Unidos) durante 1 h a 80 V. Como patrón de peso molecular se empleó el marcador 100 bp plus Ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania) cuyas bandas comprenden desde 100 pb hasta 1,5 Kb. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad Laboratories Inc., California, Estados Unidos).

Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación del gen *PAD1* en *D. hansenii* y *Z. rouxii*.

Especie	Nombre	T ^e hibridación	Tamaño amplificación	Secuencia 5' - 3'
<i>D. hansenii</i>	DhPadFw	67°	400 pb	GCGACTATGAACAGGTTTCCAACGA
	DhPadRv			CCTTCAATGTAACATCAGCGGCC
	PADDhFullFw	59°	820 pb	ACTGCAGGTCATATATCAATGAAG
	PADDhFullRv			CAACTCTTCTGATTGGTAAATGA
<i>Z. rouxii</i>	ZrPadFw	67°	750 pb	TCACAAGTCCGGGGTCCGGT
	ZrPadRv			AGCAGTCCAAAATTCTTCCGCAGG

Se purificaron aproximadamente 80 µl del producto de PCR usando el kit Ultraclean™ PCR clean-up Kit (MO-BIO, Larsband, Estados Unidos) y posteriormente fueron secuenciados en ambas direcciones usando un secuenciador automático tipo ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystem, California, Estados Unidos) por el servicio de secuenciación de MacroGen (MacroGen Europe, Ámsterdam, Holanda). Para el tratamiento, corrección y alineamiento de las secuencias se utilizó el programa ApE – A plasmid Editor (Davis, 2008. <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

En *D. hansenii* para analizar los cambios nucleotídicos en la secuencia del gen *DhPAD1*, se seleccionó una enzima de restricción que corta en una región con posibles cambios, la enzima *Rsa* I (Takara, Dalian, China). Se utilizó el producto de amplificación de los cebadores PADDhFullFw y PADDhFullRv. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final 20 µl. Se usó 10 µl del producto de amplificación del gen *DhPAD1* completo, 2 µl del Buffer 10X T, 2 µl de BSA (0,1 %), 0,5 µl de la enzima (10 U/µl) y el resto de agua hasta 20 µl de volumen final

y se incubaron a 37°C durante 16 h. Las bandas de restricción obtenidas se visualizaron cargando en un gel de agarosa al 2,5 % (p/v) 18 µl de la digestión junto con 2 µl del tampón de carga.

2.1.2 Expresión génica por RT-PCR

Se analizó la expresión del gen *DhPAD1* en tres cepas de *D. hansenii*: CECT 11369^T, Es 4, y Pr 5, la última de ellas no productora de 1,3-pentadieno. El RNA se extrajo de dos experimentos o muestras biológicas independientes. Para ello, en cada experimento a partir de su correspondiente cultivo en fase exponencial, se inocularon las cepas por duplicado en matraces con 50 ml de medio YMB a pH 7 con y sin sorbato potásico a 0,75 g/l y a una DO de 600 nm inicial de 0,05. Se incubaron a 28°C a 120 rpm durante 24 h. Este tiempo corresponde al final de la fase exponencial o principio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento y se eligió porque los matraces con sorbato comenzaban a desprender olor a 1,3-pentadieno. Se tomaron dos muestras de células de cada uno de los matraces, usando el volumen correspondiente a una DO₆₀₀ celular de 0,2 y se llevó a cabo la extracción del RNA con una modificación del protocolo descrito por Schmitt et al., (1990) basado en la extracción con fenol y cloroformo. El RNA extraído se trató con el kit DNasa Amplification Grade (Invitrogen, California, Estados Unidos) para eliminar los posibles restos de DNA.

A partir del RNA total de las muestras se realizó la síntesis del cDNA usando el MultiscribeTM reverse transcriptase kit (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). En esta reacción de 10 µl se emplearon: 2,2 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl del Buffer (10X), 2 µl de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µl de Hexámeros (10X), 0,2 µl de inhibidor de RNasa, 0,25 µl de la enzima Retro-Transcriptasa (50 U/µl) y 3,85 µl entre agua (desionizada y libre de nucleasas) y el suficiente volumen de RNA para contener 500 ng la reacción. La reacción se llevó a cabo en el termociclador (Applied Biosystem, California, Estados Unidos) en tres pasos, el primero de ellos durante 10 min a 25°C, seguido de una extensión a 48°C durante 30 minutos y el último de 95°C durante 5 min.

Para el siguiente paso de PCR a partir del cDNA sintetizado, se empleó la sonda SYBR[®]Green (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) y, a partir de los alineamientos de las secuencias obtenidas del gen *DhPAD1* y alineamientos de varias secuencias ya publicadas en el GenBank del gen *ACT1* de *D. hansenii*, se diseñaron cebadores específicos para la amplificación del gen a estudiar *DhPAD1* de *D. hansenii* (amplicón de 120 pb) y para el gen constitutivo o gen de referencia de actina *ACT1* (amplicón de 100 pb) (Tabla 3) con el software Primer Express (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Para la reacción de PCR de las muestras por

duplicado se utilizaron placas multipocillo conteniendo cada reacción 12,5 µl del Master Mix de SYBR® Green, 1 µl de cada cebador (10 pmol/µL), 2,5 µl del cDNA obtenido en la fase anterior diluido y 8 µl de agua (desionizada y libre de nucleasas). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador "7500 Real-Time PCR system" (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) con las siguientes etapas: un ciclo de 10 min a 95°C, para activar la enzima y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C para la unión de los cebadores y su extensión. La fluorescencia detectada por el aparato se registró en curvas de amplificación y los resultados se extrajeron con el software 7500 System SDS (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Estos resultados se expresan como incremento de la señal de fluorescencia de la molécula SYBR® Green cuando se une a DNA de doble hélice y este incremento es proporcional a la cantidad de amplificado en cada reacción de PCR. Durante los primeros ciclos de la reacción se establece una línea basal de fluorescencia y posteriormente, en el inicio de la fase exponencial de las amplificaciones, el software fija automáticamente una señal de fluorescencia umbral a partir de la cual se calculan los valores *Ct* de las muestras. Estos valores *Ct* indican el número de ciclos necesarios en cada muestra para alcanzar la señal umbral, de forma que cuanto menor sea su valor, más rápido ha aumentado la señal de fluorescencia y por tanto más cantidad de RNA había en la muestra (Ginzinger, 2002; Wong y Medrano, 2005).

Tabla 3. Cebadores empleados para la RT-PCR del gen *DhPAD1* y su control de expresión, *ACT1*, en *D. hansenii*.

Región que amplifica	Nombre	Secuencia 5´- 3´
Gen <i>DhPAD1</i>	PAD1_Dh_RT_FW	CATAATGGCACTTGCGTCAAA
	PAD1_Dh_RT_RV	CCAGCCAATGTCTTCATCGA
Gen <i>ACT1</i>	ACT1_Dh_RT_FW	CTCCGCCATCGAAAAGTCTT
	ACT1_Dh_RT_RV	GTCAGAAGGACGGAACAAAGCT

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión del gen *PAD1* de forma que la expresión en presencia de sorbato potásico (SK) se referenció frente a la expresión en su ausencia (Sin) para cada cepa y se normalizó con la expresión del gen constitutivo empleado como gen control o de referencia, el gen de la síntesis de actina de *D. hansenii* (*ACT1*). Esta cuantificación relativa se determinó con el método GED descrito por Schefe et al., (2006) el cual tiene en cuenta la

eficiencia real de amplificación, E , de cada pocillo. Para ello, la eficiencia de amplificación, se calculó por regresión lineal a partir de la curva exponencial de amplificación (Ramakers et al., 2003):

$$\text{Log } R_n = \text{Log } (1 + E) \cdot n + \text{Log } R_0$$

Donde R_n es la cantidad de fluorescencia en el ciclo n y R_0 la inicial. La pendiente de esa recta es $\text{Log } (1+E)$ de forma que la eficiencia será:

$$E = 10^{\text{pendiente}} - 1$$

La ecuación que se emplea en el método GED nos dará un valor de ratio de expresión relativa del gen *PAD1* (rER) en presencia de sorbato potásico (SK) en relación a las condiciones control sin sorbato (Sin) y normalizadas frente a la expresión del gen de actina *ACT1*:

$$\text{rER} = \frac{R_{\text{norm}}(\text{SK})}{R_{\text{norm}}(\text{Sin})} = \frac{(1 + E(\text{ACT1 SK}))^{\text{Ct}(\text{ACT1 SK})}}{(1 + E(\text{PAD1 SK}))^{\text{Ct}(\text{PAD1 SK})}} \times \frac{(1 + E(\text{ACT1 Sin}))^{-\text{Ct}(\text{ACT1 Sin})}}{(1 + E(\text{PAD1 Sin}))^{-\text{Ct}(\text{PAD1 Sin})}}$$

Los datos obtenidos se compararon mediante un análisis por el test no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel de significación inferior o igual al 5 %.

2.1.3 Análisis de la secuencia proteica *PAD1*

Tras analizar las secuencias similares al gen *PAD1* de *S. cerevisiae* en *D. hansenii* y *Z. rouxii*, estas se convirtieron en su correspondiente secuencia aminoacídica con el programa ApE pero teniendo en cuenta que el codón CUG de *D. hansenii* se traduce como serina y no como leucina. Posteriormente se hizo un alineamiento de dichas proteínas mediante el método CLUSTAL utilizando el programa MegAlign (Larsergene, Wisconsin, Estados Unidos) o empleando las aplicaciones web Clustal Omega (Sievers et al., 2011) y Esprit 3.x (Robert y Gouet, 2014). Para el estudio de la estructura de las proteínas se empleó la aplicación SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) que compara las secuencias aminoacídicas con la estructura de las proteínas ya depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB, Westbrook et al., 2003), las cuales ya tienen asignado un código PDB.

2.2 Gen *FDC1*

Con objeto de identificar en las especies *D. hansenii* y *Z. rouxii*, secuencias homólogas del gen *FDC1* de *S. cerevisiae* (Mukai et al., 2010, 2014) (N° de acceso GenBank NM_001180847.1), también se realizó una comparación *in silico* de esta secuencia con el genoma secuenciado de ambas especies utilizando la herramienta BLASTn del NCBI (Camacho et al., 2008).

2.2.1 Secuenciación y análisis de secuencias

En base a la secuencia nucleotídica encontrada en ambas especies se han diseñado los cebadores descritos en la Tabla 4. A continuación, se siguió el mismo protocolo que para el análisis de la secuencia del gen *PAD1* (sección 2.1.1). De esta forma, se analizó toda la secuencia de ambos genes, aproximadamente 1500 pb en ambas especies.

Tabla 4. Cebadores empleados para la amplificación del gen *FDC1* en *D. hansenii* y *Z. rouxii*.

Especie	Nombre	Tª hibridación	Secuencia 5' - 3'
<i>D. hansenii</i>	FDC1_Dh_Full_Fw	59°	CTATTTATATCCGTACGCAGACC
	FDC1_Dh_Full_Rv		TAATATGAGCAATTTAAGACCAGAG
<i>Z. rouxii</i>	FDC1_Zr_Full_Fw	59°	CCAATCAAGTACAATTCATTACC
	FDC1_Zr_Full_Rv		CTACGTGATGTTTTCTATACCTA

2.2.2 Análisis de la secuencia proteica

Se procedió del mismo modo que en la sección 2.1.3 para el estudio de las correspondientes secuencias proteicas de gen *FDC1*.

3. Desarrollo de un protocolo de PCR para la discriminación de cepas productoras de 1,3-pentadieno en *D. hansenii*

En base a los resultados de secuenciación del gen *DhFDC1* de las cepas de *D. hansenii* y tras su alineamiento usando el programa ApE – A plasmid Editor, diseñamos un cebador degenerado que abarca un cambio de base entre las cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno, el cebador FDC_Dh_Pentadien (5'CGTAGACCYTTCTCATAATAGCA 3', donde Y = Citosina o

Timina). Se usó este cebador junto con el cebador FDC1_Dh_Full_Rv que aparece en la Tabla 4 para la amplificación de la región intermedia de 130 pb aproximadamente, siguiendo el mismo protocolo descrito para el análisis de la secuencia del gen *PAD1* (sección 2.1.1) y utilizando una temperatura de hibridación de 65,8°C.

RESULTADOS

1. Producción de 1,3-pentadieno

Dado que se había sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Casas et al., 1996, 1999) un método simplificado sensorial para la detección del compuesto 1,3-pentadieno, antes de adaptarlo de forma rutinaria en esta Tesis nos propusimos comprobar su eficacia y nuestra

Tabla 5. Detección sensorial de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de *D. hansenii* con 0,75 g/l de sorbato potásico a pH 7 y 5,6.

Cepa	Detección sensorial	
	(4 días) pH 7	(>10 días) pH 5,6
CECT 10352	+	NC/NP
CECT 10360	+	+
CECT 10517	-	NC/NP
CBS 1102	+	+
CBS 1792	-	NC/NP
CBS 766	-	NC/NP
CYC 1307	+	NC/NP
J-11	+	NC/NP
PR 11	+	NC/NP
EPEC 1.3	+	+
311.1	+	NC/NP
29C1.2	+	NC/NP
29 Inf 1	+	NC/NP

-, No se detecta y +, detección de 1,3-pentadieno

NC/NP, No detección de crecimiento ni producción de 1,3-pentadieno

capacidad para llevarlo a cabo. Para ello, se comparó dicha metodología, en cepas seleccionadas, con el método de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Los ensayos se realizaron como se indica en el apartado de Material y Métodos. El pH elegido para la realización de los ensayos fue de 7 ya que a este pH y, a diferencia de los resultados obtenidos a pH 5,6 (Tabla 5), aunque la cantidad de sorbato potásico no disociada es inferior, es suficiente para detectar 1,3-pentadieno de forma más rápida, cuatro días frente a los más de diez necesarios a pH 5,6 y, además, se observa crecimiento en todas las cepas.

Mediante cromatografía pudimos comprobar que el gas recogido en el espacio de cabeza de todas las cepas que sensorialmente se consideraron como

productoras de 1,3-pentadieno, así como en las muestras que contenían 1,3-pentadieno puro, se detectaba un pico en torno a un tiempo de retención de 2,1 minutos (Figura 4). La fragmentación del espectro de masas de dicho pico también era similar, con iones característicos de 39, 53 y 67 m/z, indicando que se trata en todos los casos de 1,3-pentadieno. La cuantificación a través de la monitorización del área del ión 67 del 1,3-pentadieno en cada muestra (Tabla 6) determinó que las cepas más productoras de 1,3-pentadieno, llegando incluso transformar hasta un 45 % de la cantidad de sorbato presente en la muestra, pertenecen al género *Debaryomyces*. Por el contrario, las cepas de *Z. rouxii* y *S. cerevisiae* son las menos productoras, con cantidades que casi no superan los 10 mg/l y el 1,5 % de transformación. En ningún caso se detectó 1,3-pentadieno en las cepas determinadas sensorialmente como no productoras y en las muestras que no contenían sorbatos o levaduras.

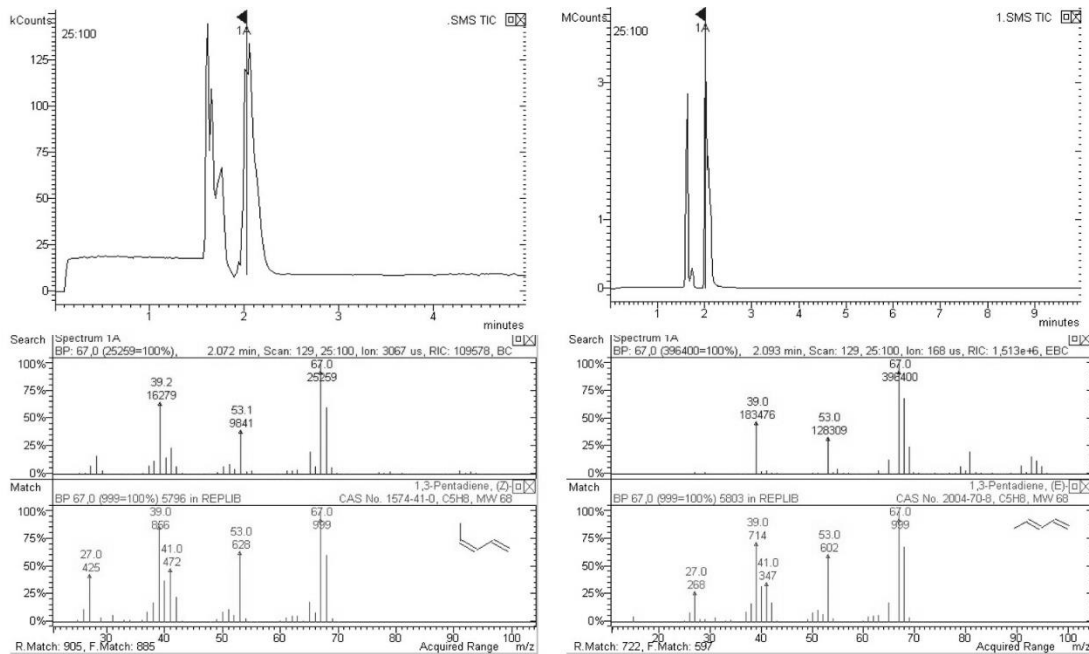


Figura 4. Cromatograma de gases (arriba) y Espectro de masas (abajo) de la inyección del gas del espacio de cabeza de una suspensión en YMB de 1,3-pentadieno puro (izquierda) y del gas de cabeza del cultivo de *D. hansenii* CECT 11369^T en YMB con 0,75 g/l de sorbato potásico (derecha). En el cromatograma de ambos se observa un tiempo de retención del compuesto de casi 2,1 minutos y espectro de masas similar.

Tabla 6. Comparación de los resultados de la detección sensorial y mediante cromatografía (GC-MS) del compuesto 1,3-pentadieno en cepas seleccionadas tras su cultivo a 0,75 g/l de sorbato potásico y pH 7.

Especie	Cepa	Origen	Detección sensorial pH 7	Detección cromatográfica pH 7 (mg/l y % conversión)
<i>D. hansenii</i>	CECT 11369 ^T	Cerveza	+	209,7 ± 32,6 (28 %)
	Es 4	Mazapán	+	333,0 ± 51,4 (44 %)
	J-12	Jamón	-	-
	PR 5	Chorizo	-	-
<i>D. fabryi</i>	CECT 11370 ^T	Lesión micótica	+	318,1 ± 49,1 (42 %)
	PR 66	Chorizo	+	324,5 ± 50,1 (43 %)
<i>Z. rouxii</i>	T2R	Turrón	+	1,7 ± 1,0 (0,2 %)
	Bch	Bollo chocolate	+	5,8 ± 1,6 (0,8 %)
	TYN 1.3	Turrón	-	-
	CYC 1484	Desconocida	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	BY 4747	Lesión micótica	+	12,3 ± 2,6 (1,6 %)
	Y05833 (ΔPAD1)		-	-
	ATCC 7754	Levadura panadería	+	7,4 ± 1,8 (1 %)
	EPO 1.1.2	Queso	-	-

-, No se detecta 1,3-pentadieno

+, Detección de 1,3-pentadieno

%, Valor de porcentaje de conversión del sorbato en 1,3-pentadieno

Tabla 7. Detección sensorial de la producción de 1,3-pentadieno en cepas de *D. hansenii* tras el crecimiento a 0,75 g/l de sorbato potásico a pH 7.

Cepa	Origen	Detección sensorial pH 7
CECT 10019	Excrementos	+
CECT 10026	Bacalao	+
CECT 10038	Excrementos	+
CECT 10284	Excrementos	+
CECT 10352	Tomate	+
CECT 10353	Tomate	+
CECT 10360	Queso	+
CECT 10378	Dátiles	+
CECT 10386	Ciruela pasa	+
CECT 10414	Alpechín	+
CECT 10517	Alpechín	-
CBS 116	Cerezas	+
CBS 164	Queso	+
CBS 766	Queso	-
CBS 1102	Salchichas	+
CBS 1792	Carne de ternera	-
CYC 1265	Berenjena conserva	+
CYC 1307	Desconocida	+
CYC 1372	Desconocida	+
J-01	Jamón	+
J-09	Jamón	+
J-11	Jamón	+
J-15	Jamón	+
J-16	Jamón	+
J-17	Jamón	+
CH 2	Chorizo	+
CH 3	Chorizo	+
CH 4	Chorizo	+
PR 5	Chorizo	-
PR 11	Chorizo	+
PR 13	Carne	+
EPEC 1.3	Queso	+
EPEC 2.1	Queso	+
EPEC 2.2	Queso	+
EPEC 3.1	Queso	+
EPEC 4	Queso	+
EPEC 4.E.1	Queso	+
EPEC 4.E.2	Queso	+
3C1.1	Queso	+
3hgE	Queso	+
3I1.1	Queso	+
3L1.1	Queso	+
29C1.1	Queso	+
29C1.2	Queso	+
29C2p	Queso	+
29I1.2	Queso	+
29 Inf 1	Queso	+

-, No se detecta y +, detección de 1,3-pentadieno

La Tabla 6 también muestra los resultados obtenidos por ambos métodos y nos permite comprobar que la técnica sensorial es una técnica adecuada para la detección de la presencia del compuesto volátil 1,3-pentadieno. Como puede observarse, se han obtenido los mismos resultados en las cepas seleccionadas. Por lo que a partir de este momento el resto de experimentos de este capítulo se realizaron utilizando el método sensorial.

Tanto en la Tabla 6 como en la 7 se muestran los resultados obtenidos para diferentes cepas de *D. hansenii* analizadas. Como puede verse, únicamente se han encontrado 5 cepas (menos de un 10 % del total) incapaces de producir 1,3-pentadieno: las cepas CECT 10517, CBS 1792, CBS 766, J-12 y PR 5. Esto indica que en *D. hansenii* casi el 90 % de las cepas, independientemente de su origen (alimentos como carnes, quesos o vegetales, hasta excrementos de animales), presentan la capacidad de descarboxilar el sorbato potásico hacia 1,3-pentadieno. Lo mismo ocurre cuando se analizan diferentes cepas de *D. fabryi*, aunque la cantidad de cepas estudiadas de esta especie es mucho menor (Tabla 6 y 8).

Lo opuesto parece ocurrir en la especie *Z. rouxii*, donde únicamente dos cepas de las 12 analizadas (el 17 %) tienen la capacidad de producir 1,3-pentadieno (Tabla 6 y 8). En el caso de *S. cerevisiae*, el 50 % de las cepas

Tabla 8. Detección sensorial de 1,3-pentadieno en cepas de otras especies de levadura tras el crecimiento a 0,75 g/l de sorbato potásico a pH 7.

Especie	Cepa	Origen	Detección sensorial pH 7
<i>D. fabryi</i>	CECT 11365	Vino blanco	+
	CBS 6066	Bronceador	+
	PR 18	Carne	+
	QB	Queso	+
<i>Z. rouxii</i>	CECT 1232T	Mosto	-
	CECT 1229	Azúcar de caña	-
	CECT 10445	Mermelada ciruela	-
	CECT 10633	Miel	-
	May 1	Azúcar líquida	-
	May 15	Azúcar líquida	-
	N3	Turrón	-
	TYN 1.1	Turrón	-
<i>S. cerevisiae</i>	CYC 1172	Zumo naranja	-
	CYC 1220	Sedimento vino	-
	YAA1	Yogur	+

-, No detección y +, detección de 1,3-pentadieno

(exceptuando, como cabría esperar, el mutante Δ PAD1) producen 1,3-pentadieno, y todas ellas, con la excepción de la cepa tipo, provienen de algún tipo de alimento (Tabla 6 y 8).

2. Estudio del gen *PAD1* en *D. hansenii* y *Z. rouxii*

Mediante análisis *in silico* en este trabajo hemos podido comprobar que *D. hansenii* presenta una región (Nº de acceso GenBank XM_461564.2) de 768 pb con un 69 % de identidad ($E=4e-56$) con el gen *PAD1* de *S. cerevisiae*, a la que llamaremos *DhPAD1*; mientras que, en contra de lo descrito previamente (Stratford et al., 2007), *Z. rouxii* posee también una región (XM_0024993261) de 745 pb con un 66 % de identidad ($E=7e-40$) con el gen *PAD1* de *S. cerevisiae* a la que llamaremos *ZrPAD1*.

2.1 *Debaryomyces hansenii*

2.1.1 Estudio de la secuencia nucleotídica y proteica del gen *DhPAD1* en cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno

En la Figura 5 aparecen los cambios más significativos del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *DhPAD1* tanto de cepas productoras de 1,3-pentadieno (azul) como no productoras (naranja) y en la Tabla 9 un resumen de los polimorfismos más importantes.

En primer lugar, se puede apreciar como la cepa CBS 766 es la que presenta un mayor número de bases diferentes. En segundo lugar, existen posiciones con tendencia a la presencia de bases distintas entre las cepas productoras y no productoras, señaladas con un rectángulo negro en la

Figura 5. En la mayoría de estas posiciones, como en la 144, 235, 363 y 398, la cepa CBS 766 contiene las mismas bases que las cepas productoras de pentadieno. A su vez, la propia cepa tipo contiene las mismas bases que las no productoras en la posición 222 y 363.

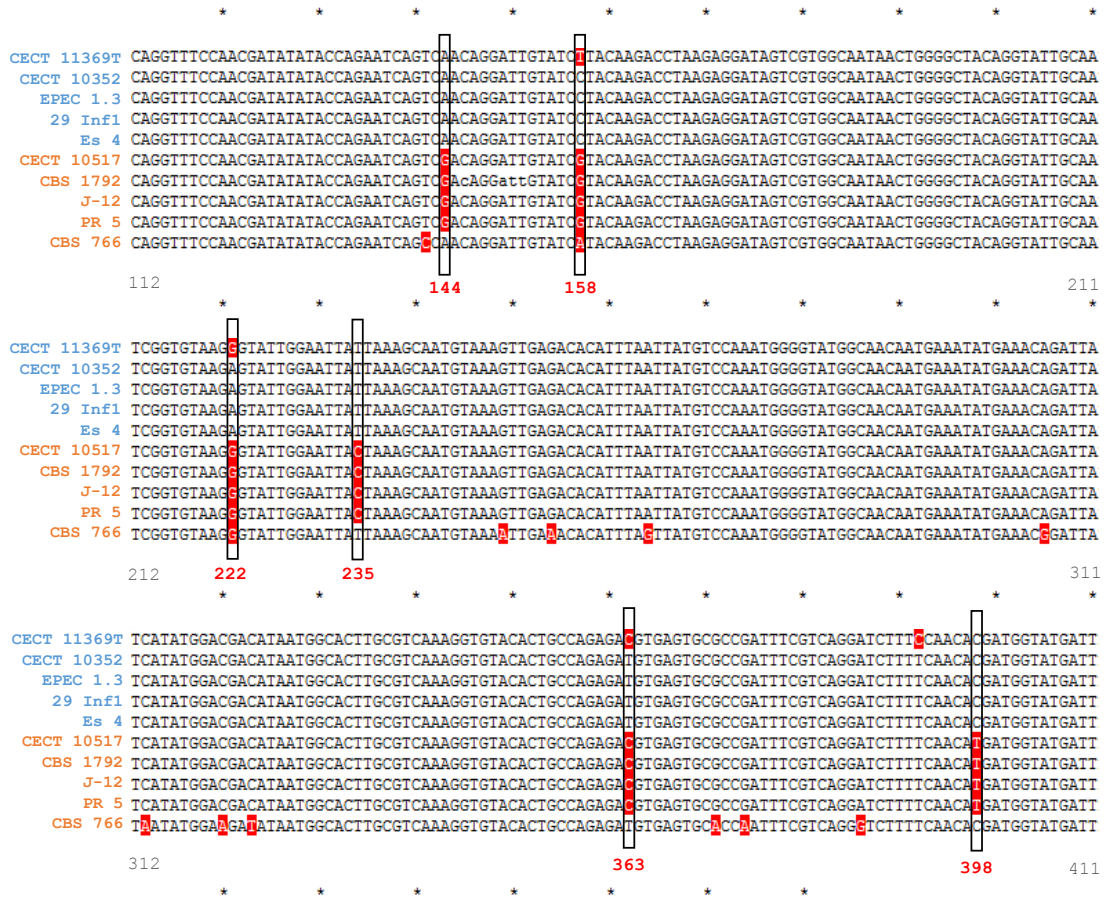


Figura 5. Parte del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *DhPAD1*, pertenecientes a diferentes cepas de *D. hansenii*, que incluyen los cambios de base más significativos. En azul aparecen diferenciadas las cepas productoras de 1,3-pentadieno y en naranja las no productoras. En rojo se resaltan las bases diferentes, y encuadradas en un rectángulo negro, las que podrían diferenciar a las cepas productoras de las no productoras de 1,3-pentadieno, denominadas con un su número de posición dentro del gen. Los números negros indican la posición dentro del gen de cada nucleótido.

También se alinearon las secuencias aminoacídicas deducidas de los amplicones del gen *DhPAD1* secuenciadas que consta de 248 aminoácidos. Se pudo comprobar que la mayoría de los polimorfismos entre cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno no da lugar a ningún cambio de aminoácidos en la proteína DhPad como se puede apreciar en la Figura 6 y la Tabla 9. Únicamente destacar dos situaciones, los cambios de residuos que conciernen a la cepa CBS 766 y un único cambio de tipo de residuo entre las cepas productoras y no productoras. Los cambios de aminoácidos en la cepa CBS 766 son la mayoría por residuos del mismo tipo, a excepción de la posición 142, donde la citosina (C) hace que ese codón sintetice una prolina (P)

(apolar) en el residuo 48, en vez de una serina (S) (polar sin carga) como en el resto de las cepas y, por otro lado, en la posición 158 que desemboca en un cambio de aminoácido en el residuo 53. Como puede verse en la Tabla 9, precisamente el cambio de base en el nucleótido 158 (T o C por G o A) genera la única diferencia de tipo de aminoácido entre las cepas productoras, conteniendo en el residuo 53 los aminoácidos apolares Leucina (L) o Prolina (P), mientras que en las cepas no productoras un residuo básico de Arginina (R). En esta posición la cepa CBS 766 contiene Histidina (H).

Tabla 9. Polimorfismos de nucleótidos en el gen *DhPAD1* que producen cambio o no de aminoácido en la secuencia proteica deducida del mismo. Los números indican la posición del nucleótido en el gen o del aminoácido en la proteína. En azul, las cepas de *D. hansenii* productoras de 1,3-pentadieno y en naranja, las no productoras.

Nucleótido	142	144	158			222	235	250	265	313	321	363	398
	T-C	A-G	T-G	T-C	T-A	G-A	T-C	G-A	A-G	C-A	C-A	C-T	C-T
Aminoácido	48	48	53	53	53	74	79	84	89	105	107	121	133
	S-P		L-R	L-P	L-H			V-I	I-V	H-N	D-E		
CECT 11369T													
CECT 10352				+		+						+	
EPEC 1.3				+		+						+	
29 Inf1				+		+						+	
Es 4				+		+						+	
CECT 10517		+	+					+					+
CBS 1792		+	+					+					+
J-12		+	+					+					+
PR 5		+	+					+					+
CBS 766	+				+				+	+	+	+	+

+ Cambio de base, que desemboca o no en cambio de aminoácido
 Tipo de aminoácido indicado por color: polar, apolar, ácido, básico

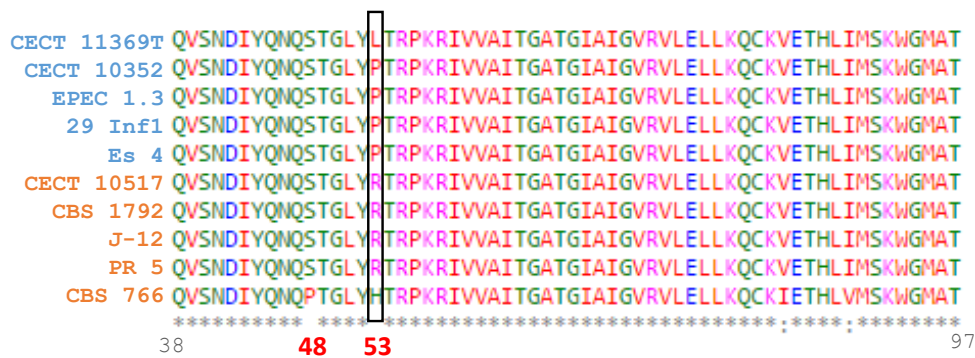


Figura 6. Parte del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los amplicones del gen *DhPAD1* de diferentes cepas de *D. hansenii* que incluye el único cambio de tipo de aminoácido (rectángulo negro) entre cepas productoras de 1,3-pentadieno (azul) y no productoras (naranja). Los residuos verdes son aminoácidos polares, los rojos apolares, los azules ácidos y los rosas básicos. Los números indican la posición de los aminoácidos dentro de la proteína.

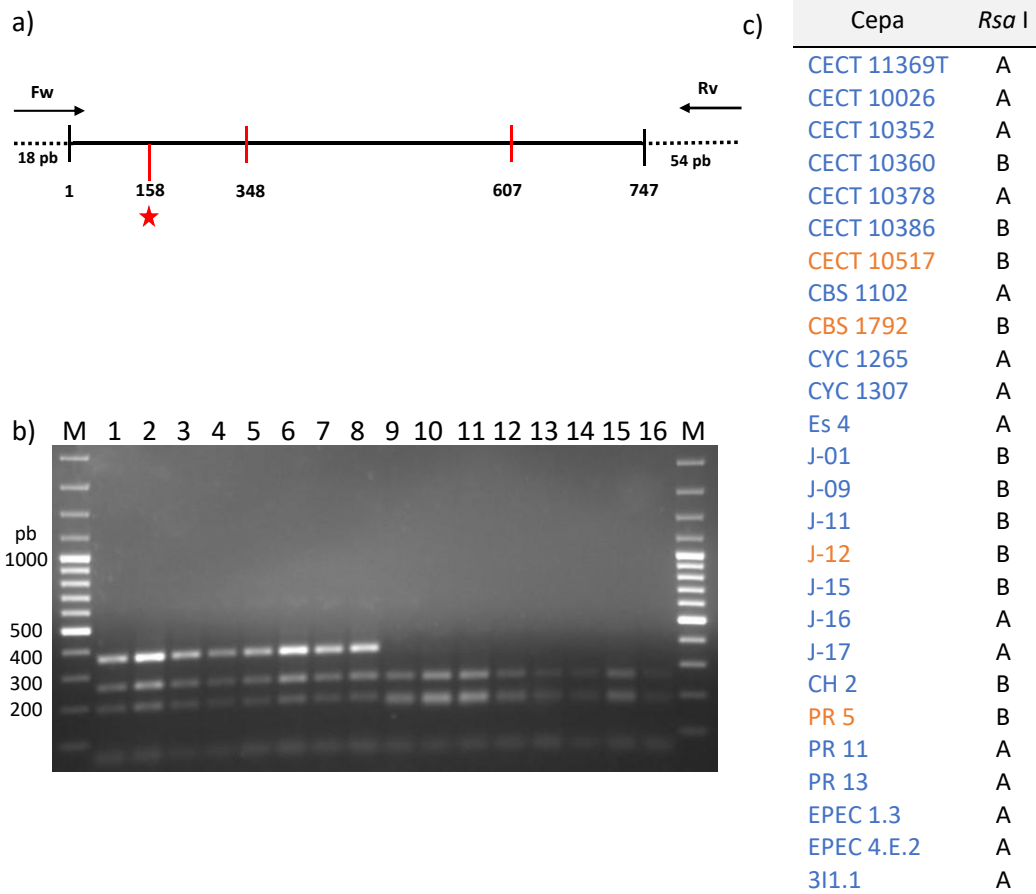


Figura 7. a) Mapa de restricción del gen *DhPAD1* de *D. hanseni* con la enzima *Rsa* I. Las dianas se encuentran en la posición 348 y 607 y en posición 158 en aquellas cepas que contengan una Guanina. **b)** Perfil de restricción del gen *DhPAD1* de cepas de *D. hanseni* con la enzima *Rsa* I. M: marcador de peso molecular 100 bp; líneas 1-16: CECT 11369T; CECT 10026; Es 4; EPEC 1.3; CECT 10352; CECT 10378; 3I1.1; CYC 1307; CECT 10360; J-01; CECT 10386; CH2; J-09; CECT 10517; CBS 1792. **c)** Tabla con los perfiles de restricción del gen *DhPAD1* de una selección de cepas de *D. hanseni* con la enzima *Rsa* I. En azul las cepas productoras de 1,3-pentadieno y en naranja las no productoras. A: La enzima *Rsa* I no corta en el nucleótido 158 y los fragmentos de restricción son: 366, 259 y 194 pb. B: La enzima *Rsa* I corta en el nucleótido 158 y los fragmentos de restricción son: 259, 194, 189 y 176 pb.

Para estudiar si el cambio de la base 158 del gen *DhPAD1* que presentan las cepas no productoras de 1,3-pentadieno y que origina el cambio de tipo de residuo en la proteína (residuo 53), es característico únicamente de las cepas no productoras, se analizó la secuencia de *DhPAD1* en otras cepas mediante la enzima de restricción *Rsa* I. Dicha enzima tiene una diana de cuatro pares de bases, GT[^]AC, la cual aparece cuando en la posición 158 hay una Guanina, como es el caso de las cepas CECT 10517, CBS 1792, PR 5 y J-12, generando cuatro fragmentos de restricción de 259, 194, 189 y 176 pb (Figura 7a), perfil B de la Figura 7 b y c. Por el contrario, cuando en dicha posición hay cualquier otra base, la enzima *Rsa* I solo tiene dos dianas, en la posición 348 y 607 generando fragmentos de 366, 259 y 194 pb (Figura 7a), el perfil A de la Figura 7 b y c.

Como se puede apreciar en la Figura 7 b y c, el cambio de base en la posición 158 aparece indistintamente tanto en cepas productoras como no productoras de 1,3-pentadieno.

2.1.2 Análisis de la expresión génica del gen *DhPAD1*

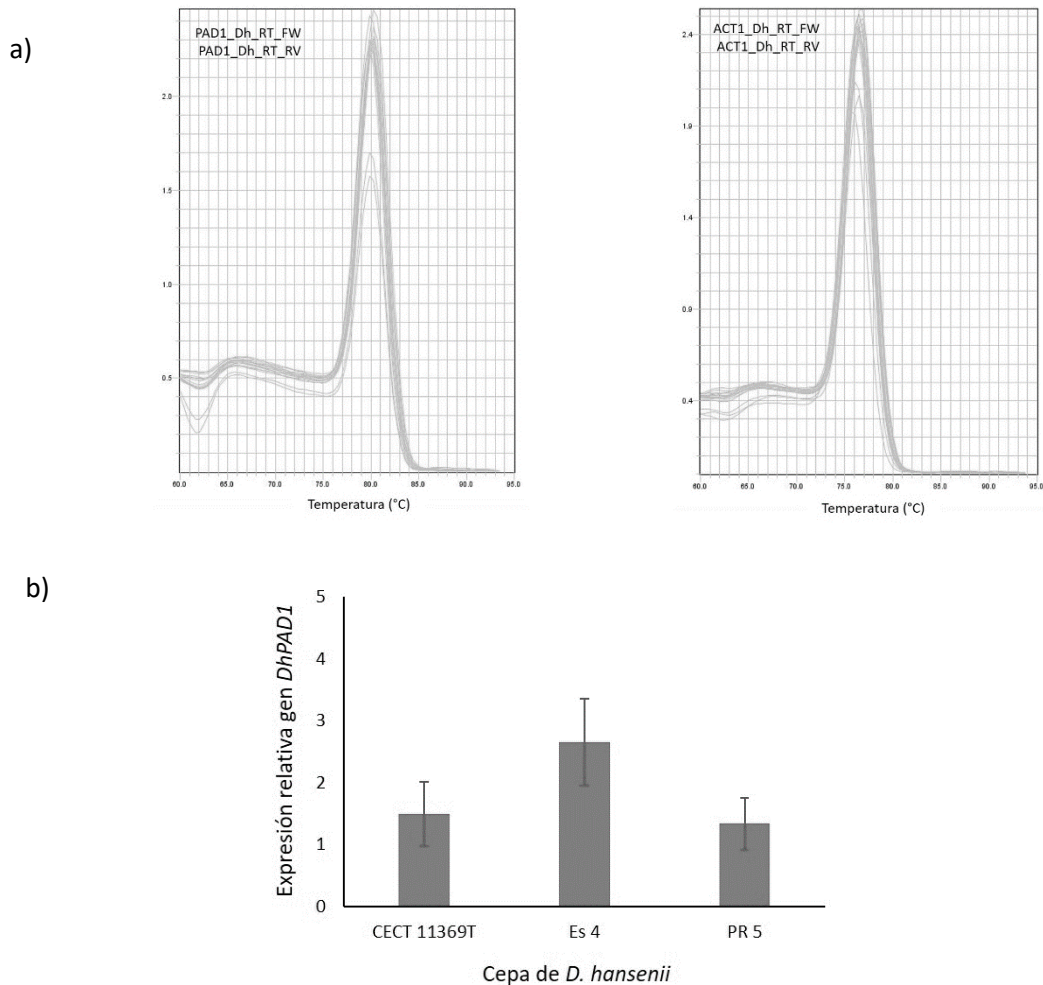


Figura 8. a) Curva de disociación del producto amplificado por los primers PAD1_Dh_RT_FW/ PAD1_Dh_RT_RV a la izquierda y ACT1_Dh_RT_FW/ ACT1_Dh_RT_RV a la derecha. b) Expresión relativa del gen *DhPAD1* de cepas de *D. hansenii* a 24 h con sorbato potásico en el medio con respecto a sin sorbato y normalizado frente a la expresión de su gen *ACT1*. Resultados obtenidos por el método GED descrito por Shefe et al., (2006). Los resultados se expresan como la media de dos experimentos independientes junto con su error típico.

En vista de que la secuencia del gen *DhPAD1* no parece tener cambios significativos que expliquen por qué algunas cepas de *D. hansenii* no producen 1,3-pentadieno, nos planteamos la hipótesis de que pudiese tratarse de diferencias en la expresión de dicho gen. La curva de disociación de las parejas de primers diseñados para la cuantificación relativa mostró un único pico (Figura 8a) indicando que únicamente había amplificación de un fragmento específico y no se formaban dímeros con un temperatura de fusión de 80,05 y 76,46 °C para el gen *PAD1* y *ACT1*

de *D. hansenii* respectivamente. No se obtuvo amplificación en ninguno de los controles de las muestras (RT- y NTC, controles con RNA pero sin retrotranscriptasa y controles con agua respectivamente). Hemos utilizado uno de los métodos de cuantificación relativa que en vez de asumir una eficiencia constante en todas las reacciones, tiene en cuenta la eficiencia real de cada una de ellas (método GED de Schefe et al., (2006)). Las eficiencias se calcularon por regresión lineal a partir de la curva exponencial de amplificación, tal como se indica en el apartado 2.1.2 de Material y Métodos y únicamente se consideraron para la cuantificación relativa aquellas réplicas de cada muestra con eficiencias de amplificación de ambos genes entre 0,9 y 1 y coeficiente R^2 superior a 0,99.

La Figura 8b muestra la expresión relativa del gen *DhPAD1* a las 24 h obtenida como la media de las correspondientes réplicas dos muestras biológicas independientes junto con su error típico. Los valores indican el número de veces que se expresa más el gen *DhPAD* con sorbato potásico en el medio, que en las condiciones control sin sorbato (establecidas con el valor de 1) y tras su normalización con la expresión del gen de actina. Como se observa en dicha Figura 8b, el nivel de expresión a las 24 h de las cepas estudiadas en presencia de sorbato potásico fue entre 1,3 y 2,5 veces más que respecto a las condiciones control de ausencia de conservante y se observaba también expresión en la cepa PR5 no productora de 1,3-pentadieno. Sin embargo, el análisis estadístico reveló que las diferencias de expresión entre cepas y en ausencia y presencia de sorbato potásico no eran estadísticamente significativas (asumiendo un nivel de significación igual o inferior al 5%).

2.2 *Zygosaccharomyces rouxii*

Dados los resultados obtenidos con la especie de levadura *D. hansenii*, en *Z. rouxii*, se procedió directamente a analizar la región del genoma (XM_0024993261) con un 66 % de identidad con el gen *PAD1* de *S. cerevisiae*, a la que llamamos gen *ZrPAD* y la cual tiene un tamaño de 744 pb.

Se diseñaron cebadores específicos de la misma y tras su amplificación se procedió a la secuenciación del gen en dos cepas que producen pentadieno, Bch y T2R y de tres que no lo hacen. Posteriormente se alinearon para ver las diferencias entre ellas. En la Figura 9 aparece una parte del alineamiento de dichas secuencias. Como se puede apreciar en ella, no existen diferencias entre los nucleótidos de ninguna de las secuencias pertenecientes a las diferentes cepas analizadas y por consiguiente ningún cambio en los residuos de la proteína Pad de *Z. rouxii* que expliquen la incapacidad/capacidad de producir 1,3-pentadieno a partir de sorbatos.

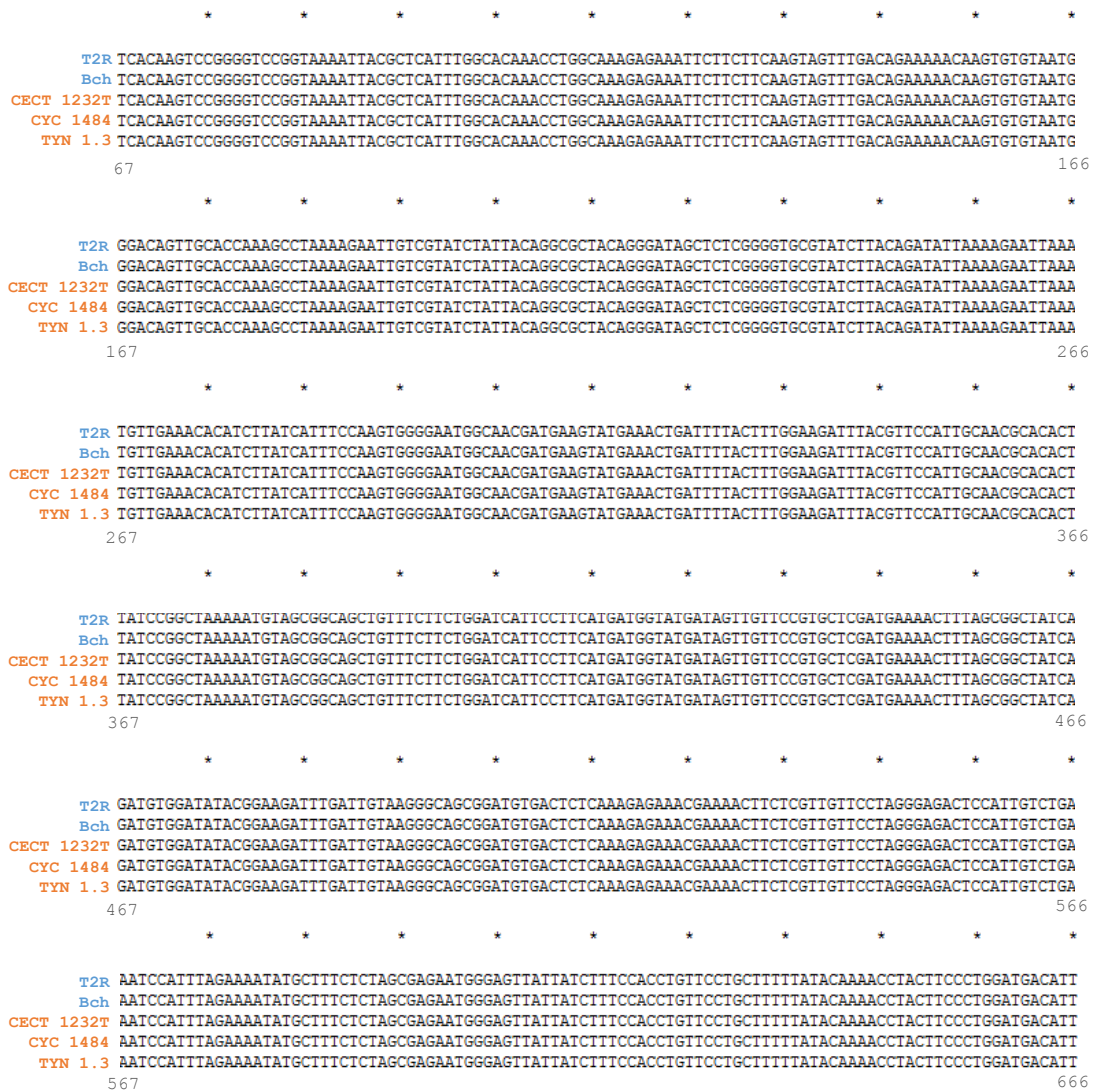


Figura 9. Alineamiento de una parte de las secuencias nucleotídicas del gen *ZrPAD1* de diferentes cepas de *Z. rouxii*. En azul aparecen diferenciadas las cepas productoras de 1,3-pentadieno y en naranja las no productoras. Si existen diferencias de bases se resaltan en rojo. Los números negros indican la posición dentro del gen de cada nucleótido.

2.3 Análisis comparativo de la proteína Pad1 de diferentes especies

Se ha realizado un alineamiento y comparación de la proteína Pad1 de *S. cerevisiae* con las proteínas de otras especies capaces de descarboxilar sorbatos en 1,3-pentadieno, como *Aspergillus niger* (ABN13117) (Plumridge et al., 2008), *Candida albicans* (XP_718069.1) (Stratford et al., 2007) junto a las proteínas de las especies *D. hansenii* y *Z. rouxii*. Los residuos conservados en todas las especies comparadas aparecen sobre un fondo rojo en la Figura 10. Al analizar su estructura secundaria con la aplicación SWISS-MODEL, en primer lugar todas

presentaban una identidad del 54-58 % con el modelo de proteína con código PDB 1SBZ y

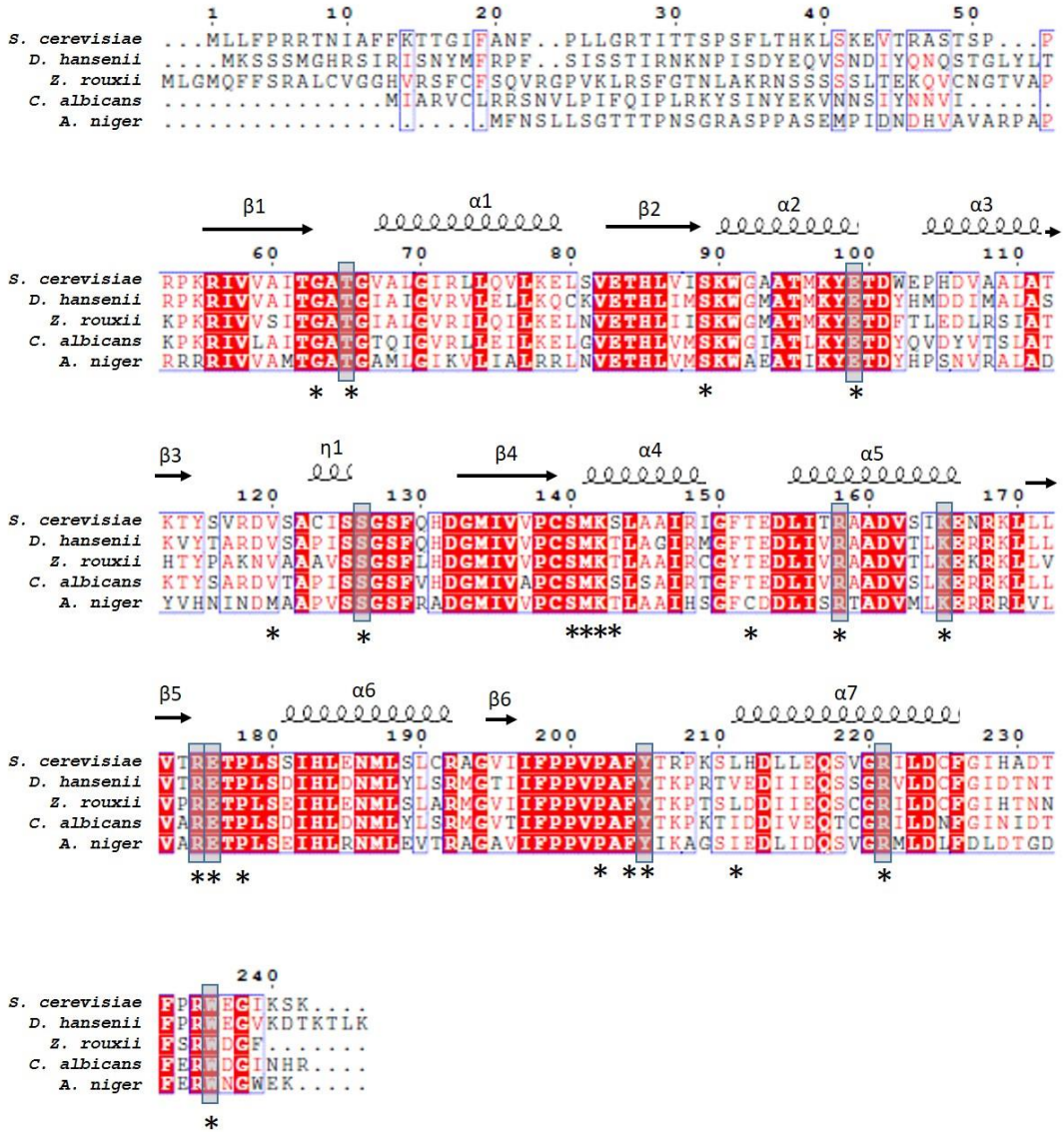


Figura 10. Alineamiento de las secuencias proteicas Pad presentes en diferentes especies. Sombreados en rojo aparecen los residuos conservados y encuadrados con letras rojas los residuos similares. Los residuos dentro de rectángulos grises están implicados en la unión al fosfato del DMAP, ruptura del fosfato del resto dimetilalil o en su posterior unión y reducción del FMN (White et al., 2015). Los residuos marcados con un asterisco son los residuos que según el estudio de Rangarajan et al., (2004) estarían implicados en la dimerización, en la unión a sustrato o en la unión a FMN. En cuanto a la estructura secundaria de la proteína, encima de los alineamientos aparecen marcados los residuos que forman las α hélices, las láminas β ó las hélices 3_{10} (η).

concretamente la secuencia de *D. hansenii* y *Z. rouxii* un 54 %. Este modelo pertenece al análisis cristalográfico de la proteína descarboxilasa dodecamérica tipo UbiX (Pad1) de *E. coli* O157:H7

del estudio de Rangarajan et al., (2004). En la Figura 10 se encuentran destacados con un asterisco los residuos conservados que cita este autor.

El otro modelo de proteína con el que las proteínas Pad de estas especies presentaban una mayor identidad (43-45 % *A. niger*, *C. albicans* y *S. cerevisiae*, 42,5 % la de *D. hansenii* y 39 % la de *Z. rouxii*) fue con la proteína con el código PDB 4ZAN perteneciente a la proteína UbiX de *Pseudomonas aeruginosa*. El análisis cristalográfico de esta proteína se realizó en el trabajo de White et al., en 2015. Encuadrados en rectángulos grises aparecen los residuos importantes para la función de esta enzima según este autor.

Tanto en *Z. rouxii* como en *D. hansenii* las proteínas Pad1 contienen los aminoácidos que en ambos estudios y modelos se señalaron como los más importantes para la función de las enzimas Pad/UbiX. En dichos modelos proteicos, la estructura secundaria de la proteína estaría formada por 7 α hélices, una pequeña hélice de tipo 3_{10} (η) y 6 láminas β , formando así uno de los monómeros de estructura dodecamérica descrita para los dos modelos de proteínas (Figuras 10 y 11).

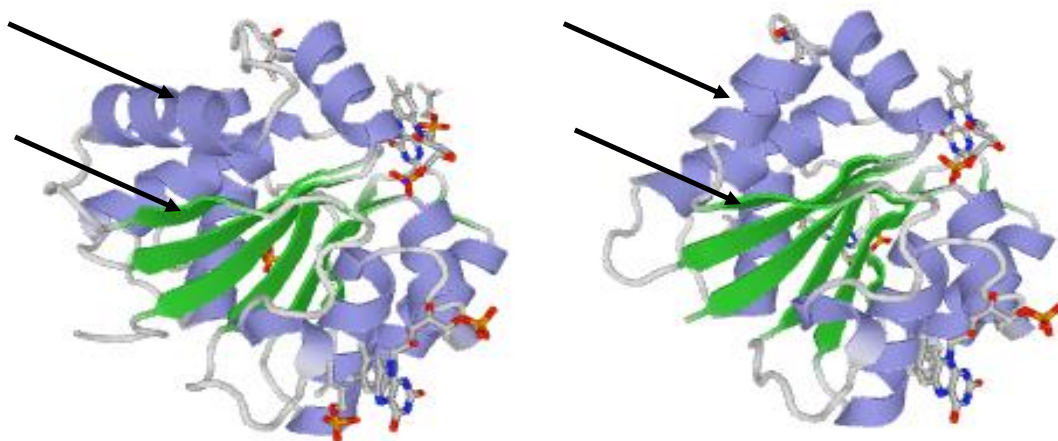


Figura 11. Estructura terciaria de las proteínas UbiX de *P. aeruginosa* (izquierda) y UbiX/Pad1 de *E. coli* (derecha) con las cuales presentaban más identidad las proteínas Pad1 de *S.cerevisiae*, *D. hansenii*, *Z. rouxii*, *C. albicans* y *A. niger* tras su análisis con la aplicación SWISS-MODEL. Las flechas indican las zonas donde están situada las regiones que son más variables en dichas especies, $\alpha 3$ y $\beta 3$.

La identidad de las proteínas Pad, tanto de *D. hansenii* y *Z. rouxii* como del resto de especies analizadas, con los modelos proteicos Pad1 de *E. coli* y UbiX de *P. aeruginosa* no supera el 55 %. Concretamente la zona de los residuos de la $\alpha 3$ y la $\beta 3$ es muy variable (Figura 10 y 11). En el caso de *Z. rouxii* y en *D. hansenii* no contienen residuos del mismo tipo a los de $\alpha 3$ y $\beta 3$ del modelo de la UbiX de *P. aeruginosa*. Lo mismo ocurre en estas especies con la $\beta 3$ en el modelo Pad1 de *E. coli*.

3. Estudio del gen *FDC1* en *D. hansenii* y *Z. rouxii*

S. cerevisiae posee un gen próximo al gen *PAD1*, el gen *OHB1/FDC1* (N° de acceso GenBank NM_001180847.1), que codifica para una proteína que podría ser necesaria, junto con Pad1p, para la descarboxilación de ácidos fenilacrílicos (Mukai et al., 2010; Plumridge et al., 2010), aunque desde el inicio hasta el final de esta Tesis no se había publicado su función exacta. Mediante análisis *in silico* hemos identificado una región nucleotídica en el genoma de *D. hansenii* y *Z. rouxii*.

3.1 *Debaryomyces hansenii*

D. hansenii tiene una región en su genoma (N° de acceso GenBank XM_461563.1) que presenta un 66 % de identidad ($E=3e-88$) con el gen *FDC1* de *S. cerevisiae*, a la que llamaremos *DhFDC1*. Esta secuencia se encuentra a 528 pb de la secuencia *DhPAD1*, tiene un tamaño de 1542 pb y se traduce en dirección opuesta. Para su amplificación, en este trabajo se diseñaron cebadores específicos. Posteriormente, se secuenciaron y alinearon las secuencias de diferentes cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno. Entre ellas la CECT 10386 y CH 2 porque son un ejemplo de cepas productoras de 1,3-pentadieno que en la posición 158 del gen *DhPAD1* presentaban una G que originaba un cambio de aminoácido en la posición 53 de la proteína, como ocurría en las cepas no productoras (Figuras 5 y 6). Es de destacar que el protocolo de PCR junto con los cebadores empleados no amplificaban en la cepa CBS 766. En la Figura 12 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica y en la Figura 13 el de las secuencias aminoacídicas deducidas de estos amplicones, teniendo en cuenta que el codón CUG se traduce como una serina en vez de una leucina. En la Tabla 10 aparece un resumen de los polimorfismos más importantes.

En primer lugar, existen posiciones del gen, como las 127, 954, 1119 y 1434 (encuadradas en un rectángulo negro en la Figura 12) cuyos cambios de base son exclusivas de las cepas no productoras de 1,3-pentadieno. Sin embargo, solo la primera y la última llevan a un cambio de aminoácido (Tabla 10). En segundo lugar, existen posiciones en las que aparece un cambio de base de todas las cepas no productoras de 1,3-pentadieno, cambio que comparten bien con la cepa tipo o bien con las cepas CECT 10386 y CH2, o con las tres, pero solo en la mitad de ellas se produce un cambio de aminoácido (Tabla 10). En tercer lugar, la cepa tipo es una de las cepas que más polimorfismos únicos tiene. Y por último y más importante, todas las cepas no

Tabla 10. Polimorfismos de nucleótidos en el gen *DhFDC1* que producen cambio de aminoácidos en la secuencia proteica deducida del mismo. Los números indican la posición del nucleótido en el gen o del aminoácido en la proteína. En azul, las cepas de *D. hansenii* productoras de 1,3-pentadieno y en naranja, las no productoras.

Nucleótido	127	145	156	281	328	362	367	383		458	733	775	798
	G-A	C-T	A-T	*	A-G	T-C	C-A	G-A	*	A-C	G-A	A-G	T-A
Aminoácido	43	49	52	94	110	121	123	128	128	153	245	259	266
	V-I	P-S	L-F	Alt	I-V	V-A	L-I	G-E	Alt	H-P	D-N	K-E	H-Q
CECT 11369T													
CECT 10352		+						+			+		
CECT 10386			+		+	+	+			+		+	+
CH2			+		+	+	+			+		+	+
EPEC 1.3		+						+			+		
CECT 10517	+		+		+	+	+		+	+		+	+
CBS 1792	+		+		+	+	+		+	+		+	+
J-12	+		+		+	+	+		+	+		+	+
PR 5	+		+	+	+	+	+		+	+		+	+
Nucleótido	1127	1183	1234	1251	1329	1389	1434						
	A-G	C-A	*	T-A	G-A	A-C	A-T						
Aminoácido	376	395	412	417	443	463	478						
	K-R	L-I	Alt	D-E	M-I	K-N	K-N						
CECT 11369T													
CECT 10352		+											
CECT 10386	+			+	+	+							
CH2	+			+	+	+							
EPEC 1.3		+											
CECT 10517	+			+	+	+	+						
CBS 1792	+			+	+	+	+						
J-12	+			+	+	+	+						
PR-5	+		+	+	+	+	+						

+, Cambio de base, que desemboca en cambio de aminoácido. En gris situación si no estuviera alterado el marco de lectura; *, Deleción de una base; Alt, alteración del marco de lectura; Tipo de aminoácido indicado por color: polar, apolar, ácido, básico.

productoras de 1,3-pentadieno contienen al menos una deleción en la secuencia nucleotídica de *DhFDC1* (marcadas con una estrella en la Figura 12 y señaladas en la Tabla 10). Existe una deleción común de una adenina o guanina en posición 383 que alteraría el marco de lectura y además, en la cepa PR 5 aparecen dos deleciones adicionales, una anterior a esa posición en el nucleótido 281 (timina) y una posterior en el nucleótido 1234 (adenina). La primera deleción en esta cepa le provoca una alteración del marco de lectura que hace que se traduzca en una serie de aminoácidos diferentes (Figura 13) hasta que, después de 7 codones, aparece un codón STOP UGA (Figura 14). En el resto de cepas no productoras, la CECT 10517, CBS 1792 y la J-12, la deleción en la posición 383 ocasiona de igual modo que en la PR 5, una alteración del marco de lectura traduciendo en 15 aminoácidos (Figura 13) hasta la aparición de el codón STOP UGA que trunca el resto de la proteína (Figura 14). Esto provoca, como se puede apreciar en la Figura 13, que las proteínas de aquellas cepas no productoras de 1,3-pentadieno aparecen alteradas antes de los primeros 150 aminoácidos de la proteína.

* * * * *

CECT 11369T TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 CECT 10352 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 CECT 10386 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 CH 2 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 EPEC 1.3 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 CECT 10517 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 CBS 1792 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 J-12 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA
 PR 5 TGAGAAATGAIITTAGTAGAGATTACCCACGAGTGCATCCAAACTTAGAGGTGGGTGCTATTATGAGAAGGCTCTACGAAGAAAAATTGCAGTACCTTTA

57 127 156

* * * * *

CECT 11369T TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTCGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 CECT 10352 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTCGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 CECT 10386 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 CH 2 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 EPEC 1.3 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 CECT 10517 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 CBS 1792 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 J-12 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG
 PR 5 TTCAAAAACCTTGAAGAAGGACCTAAAAATCCAGACCCCTAGTAATTTGTTCAATATTGTTGGCTGCTTTGGTGGTTTAAAGAGATGCAAAAAAAGACAATG

157 256 281

* * * * *

CECT 11369T ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 CECT 10352 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 CECT 10386 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 CH 2 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 EPEC 1.3 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 CECT 10517 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 CBS 1792 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 J-12 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC
 PR 5 ATCATGCTAGAATTGCTCTTCATTGGGGTTGGATTACAAAACCTCCTATGACGAAGATTATTGACTACTTGATAGAAGCCAAACCAAGAAGCCCTCTCC

257 356 381

* * * * *

CECT 11369T ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 CECT 10352 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 CECT 10386 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 CH 2 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 EPEC 1.3 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 CECT 10517 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 CBS 1792 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 J-12 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT
 PR 5 ACCAGCTTGTGTTGAAGATGCATCGGAGCCATGCAAAAAAACAAGATTCTGGAGATGATATTAGGTTGAACGCATTACCTGCACCTACGTTGCAT

357 456 383

* * * * *

CECT 11369T CATGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 CECT 10352 CATGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 CECT 10386 CTTGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 CH 2 CTTGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 EPEC 1.3 CATGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 CECT 10517 CTTGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 CBS 1792 CTTGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 J-12 CTTGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT
 PR 5 CTTGGGGATGGTGGGAAGTATATTACAGACTTACGGAATGTTTGTGTTACAAAACAGCAGACAAGACCTGGACAAATGGTCAATTGCCAGAGGAATGATT

457 556

* * * * *

CECT 11369T ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCA⁵CATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT
 CECT 10352 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT
 CECT 10386 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATA¹CGTCCCATT
 CH 2 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATA¹CGTCCCATT
 EPEC 1.3 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT
 CECT 10517 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT
 CBS 1792 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT
 J-12 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT
 PR 5 ATGATGATAAGCATTAACTGGTTGGTTATGAATCCGCAACATATTAGAAGGGTTGCAGACACATGGGCTGAAATGGTATGGGTGATAGCGTCCCATT

557 656

* * * * *

CECT 11369T TGCATTATGTTTCGGTGTACCACC⁵GCATCAATTTTGTAGTGGT¹ATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 CECT 10352 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 CECT 10386 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 CH 2 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 EPEC 1.3 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 CECT 10517 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 CBS 1792 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 J-12 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT
 PR 5 TGCATTATGTTTCGGTGTACCACCTGCATCAATTTTGTAGTGGT¹CAATGCCTATCCAGATGGTGTACAGAAGCT¹ACTATATTGGTGTCTTGTAGTCGGT

657 756

* * * * *

CECT 11369T GAACCTTTAAGTGTGTTAAGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 CECT 10352 GAACCTTTAAGTGTGTTAAGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 CECT 10386 GA⁵CCCTTTAAGTGTGTT¹AGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 CH 2 GA⁵CCCTTTAAGTGTGTT¹AGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 EPEC 1.3 GAACCTTTAAGTGTGTTAAGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 CECT 10517 GA⁵CCCTTTAAGTGTGTT¹AGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 CBS 1792 GA⁵CCCTTTAAGTGTGTT¹AGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 J-12 GA⁵CCCTTTAAGTGTGTT¹AGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG
 PR 5 GA⁵CCCTTTAAGTGTGTT¹AGTGTGAGACCAATGATTAC⁵GTTCTGCCGATTCTGAAATGGTTTTCGAAGGTACCTTGAATTTGAATAAAGTGGTTG

757 856

* * * * *

CECT 11369T AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGG⁵CACCCTTGTCCATTATATACTGTTG¹ACTATAACGTACAGAGATGA¹GC
 CECT 10352 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGTACAGAGATGA¹GC
 CECT 10386 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGT¹AGAGATGA¹GC
 CH 2 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGT¹AGAGATGA¹GC
 EPEC 1.3 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGTACAGAGATGA¹GC
 CECT 10517 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGT¹AGAGATGA¹GC
 CBS 1792 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGT¹AGAGATGA¹GC
 J-12 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGT¹AGAGATGA¹GC
 PR 5 AAGAAGGTCCATTTGGTGAATGCAITGGTTACTGTTCCCTGGACATGGACACCCTTGTCCATTATATACTGTTGAGACTATAACGT¹AGAGATGA¹GC

857 956

* * * * *

CECT 11369T TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTAC⁵GATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 CECT 10352 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 CECT 10386 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 CH 2 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 EPEC 1.3 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 CECT 10517 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 CBS 1792 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 J-12 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT
 PR 5 TATATTACCAAGTTTCAAACCCAGGTTTATGTACGGATGAGACACATACATTAATCGGTGGATTAGTCAGTGCCGAATGCAAGCAAATGGCCTTAGAACAT

957 1056

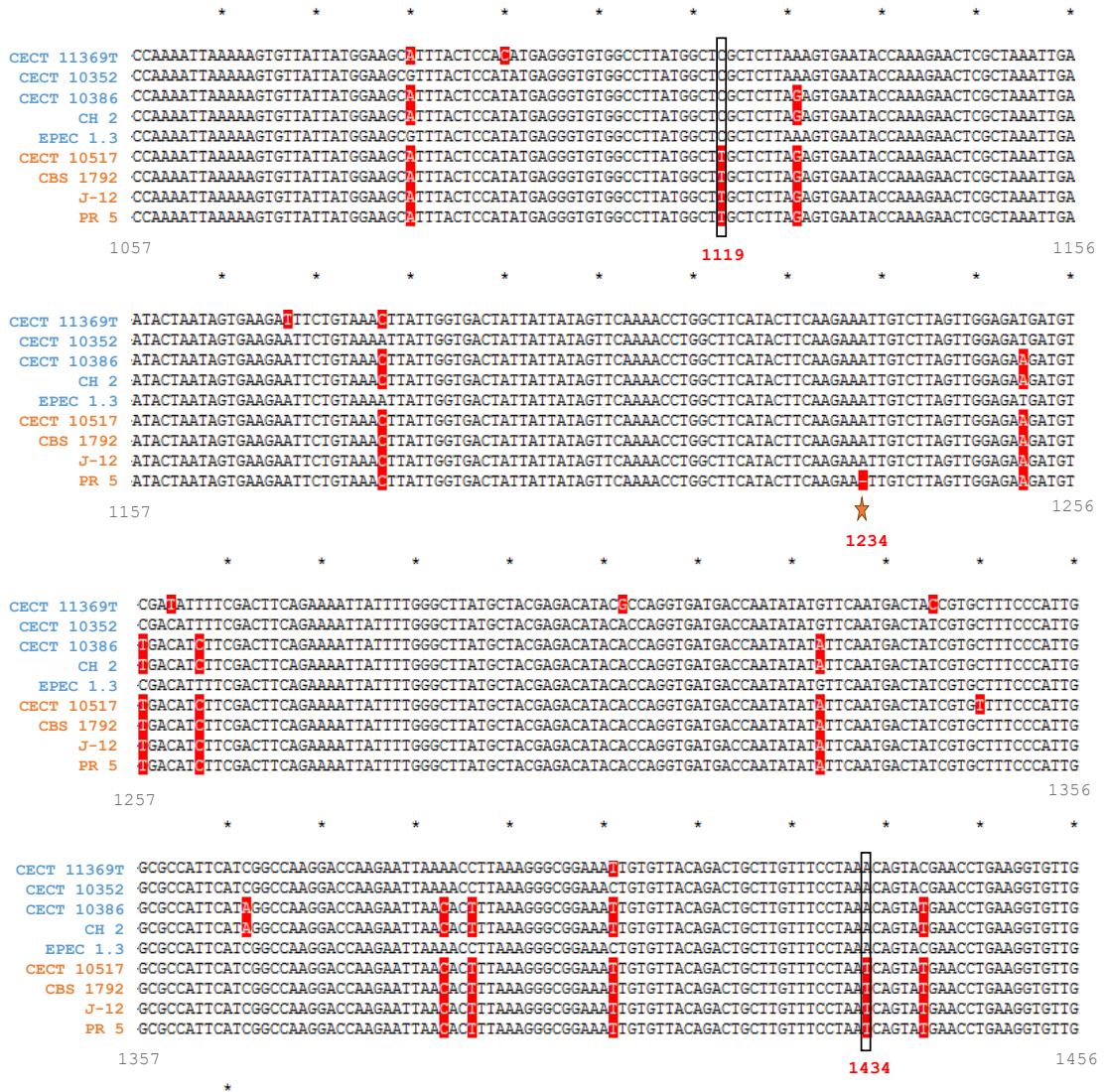


Figura 12. Parte del alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *DhFDC1*, pertenecientes a diferentes cepas de *D. hansenii* que incluyen los cambios de base más significativos. En azul, aparecen diferenciadas las cepas productoras de 1,3-pentadieno y en naranja, las no productoras. En rojo se resaltan las bases diferentes, y encuadradas en un rectángulo negro, las que podrían diferenciar a las cepas productoras de las no productoras de 1,3-pentadieno, denominadas con un su número de posición dentro del gen. Las estrellas muestran donde hay nucleótidos delecionados. Los números negros indican la posición de cada nucleótido dentro del gen.

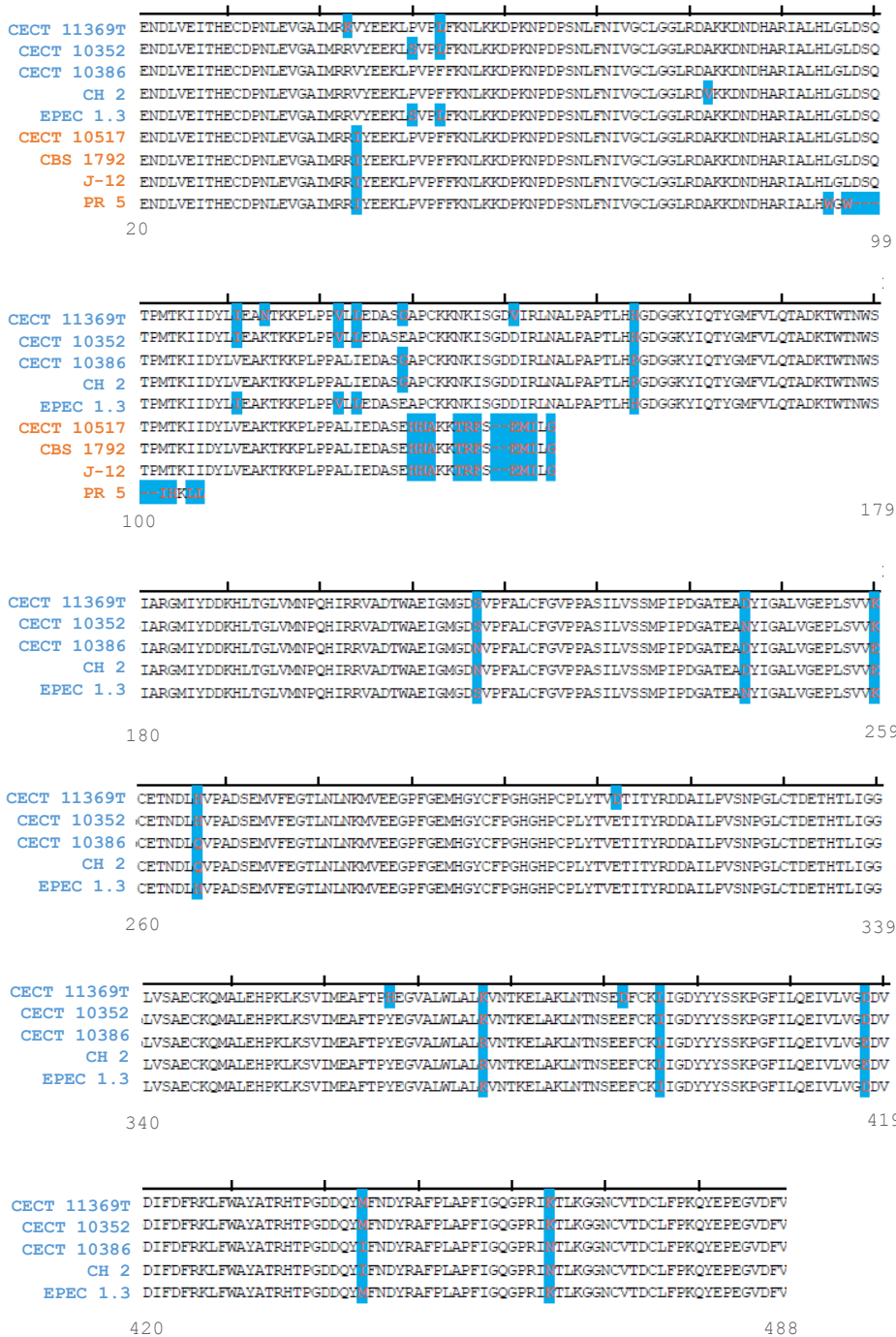


Figura 13. Parte del alineamiento de parte de las secuencias de aminoácidos deducidas de los amplicones del gen *DhFDC1* de diferentes cepas de *D. hanseni*. En azul, las cepas productoras de 1,3-pentadieno y en naranja, las no productoras. Los residuos diferentes están destacados en azul. Los números indican la posición del aminoácido en la proteína.

D. hansenii PR 5

```

58 GAG AAT GAT TTA GTA GAG ATT ACC CAC GAG TGC GAT CCA AAC TTA GAG
20 E N D L V E I T H E C D P N L E
106 GTG GGT GCT ATT ATG AGA AGG ATC TAC GAA GAA AAA TTG CCA GTA CCT
36 V G A I M R R I Y E E K L P V P
154 TTT TTC AAA AAC TTG AAG AAG GAT CCT AAA AAT CCA GAC CCT AGT AAT
52 F F K N L K K D P K N P D P S N
202 TTG TTC AAT ATT GTT GGC TGT CTT GGT GGT TTA AGA GAT GCA AAA AAA
68 L F N I V G C L G G L R D A K K
250 GAC AAT GAT CAT GCT AGA ATT GCT CTT CAT TGG GGT TGG ATT CAC AAA
84 D N D H A R I A L H W G W I H K
298 CTC CTA TGA
100 L L *
```

D. hansenii CECT 10517 / CBS 1792 / J-12

```

58 GAG AAT GAT TTA GTA GAG ATT ACC CAC GAG TGC GAT CCA AAC TTA GAG
20 E N D L V E I T H E C D P N L E
106 GTG GGT GCT ATT ATG AGA AGG ATC TAC GAA GAA AAA TTG CCA GTA CCT
36 V G A I M R R I Y E E K L P V P
154 TTT TTC AAA AAC TTG AAG AAG GAT CCT AAA AAT CCA GAC CCT AGT AAT
52 F F K N L K K D P K N P D P S N
202 TTG TTC AAT ATT GTT GGC TGT CTT GGT GGT TTA AGA GAT GCA AAA AAA
68 L F N I V G C L G G L R D A K K
250 GAC AAT GAT CAT GCT AGA ATT GCT CTT CAT TTG GGG TTG GAT TCA CAA
84 D N D H A R I A L H L G L D S Q
298 ACT CCT ATG ACG AAG ATT ATT GAC TAC TTG GTA GAA GCC AAG ACC AAG
100 T P M T K I I D Y L V E A K T K
346 AAG CCT CTT CCA CCA GCC TTG ATT GAA GAT GCA TCG GAG CAC CAT GCA
116 K P L P P A L I E D A S F H H A
394 AAA AAA ACA AGA TTT CTG GAG ATG ATA TTA GGT TGA
132 K K T R F S E M I L G *
```

Figura 14. Secuencia de nucleótidos del gen *DhFDC1* y aminoácidos de su correspondiente proteína en verde. En azul se resalta el triplete sobre el cual afecta la delección, indicada por la flecha negra. En fucsia se destaca el codón STOP que aparece tras la alteración del marco de lectura que provoca la delección.

3.2 *Zygosaccharomyces rouxii*

El genoma de *Z. rouxii* tiene una región (N° de acceso GenBank XM_002499327) con un 65 % de identidad ($E=4e-53$) con el gen *FDC1* de *S. cerevisiae* a la que llamaremos *ZrFDC1*. Dicha secuencia se encuentra a 539 pb de *ZrPAD1* y tiene un tamaño de 1536 pb y se traduce en dirección opuesta. Se diseñaron cebadores específicos para su amplificación y posteriormente se secuenciaron y alinearon las secuencias de dos cepas que producen 1,3-pentadieno, las cepas Bch y T2R y de tres que no lo producen: la cepa CECT 1232T, CYC 1484 y TYN 1.3. Como se aprecia en la Figura 15 donde se muestran las únicas regiones con algún nucleótido diferente, la

secuenciación del gen *ZrFDC1* de las cepas analizadas no presentaba diferencias, únicamente una timina en la cepa tipo en la posición 23 y un único cambio de base en las cepas T2R y Bch.



Figura 15. Parte del alineamiento de las regiones de las secuencias nucleotídicas del gen *ZrFDC1* pertenecientes a cepas de *Z. rouxii* que contiene las diferencias resaltadas en rojo. En azul las cepas productoras de 1,3-pentadieno y en naranja las no productoras. Los números indican la posición de las bases dentro del gen.

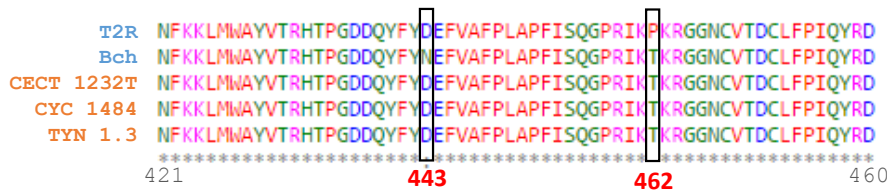


Figura 16. Parte del alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los amplicones del gen *ZrFDC1* de diferentes cepas de *Z. rouxii* que incluye los únicos cambios de aminoácido (rectángulo negro) en cepas productoras de 1,3-pentadieno (azul) y no productoras (naranja). Tipo de aminoácido indicado por color: polar, apolar, ácido, básico. Los números indican la posición del aminoácido dentro de la proteína.

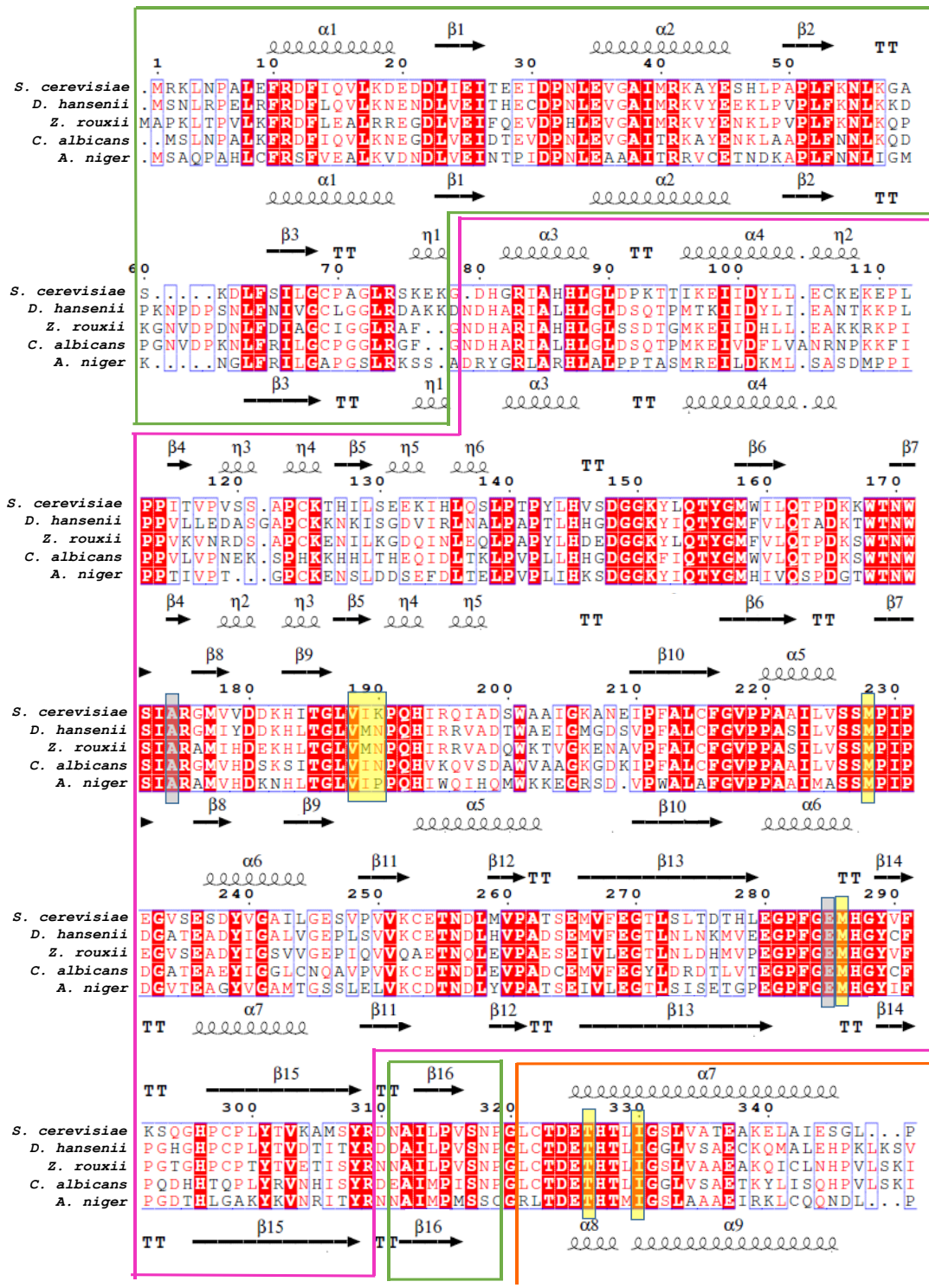
A diferencia de *D. hansenii*, no se han detectado ninguna delección o cambio significativo de bases que ayuden *a priori* a predecir que la secuencia proteica puede presentar importantes diferencias. El análisis de la secuencia proteica deducida correspondientes a las secuencias nucleotídicas de las diferentes cepas (Figura 16) comprobó que, como era de esperar, no se preciden cambios significativos en ellas. Únicamente cabe destacar en la cepa tipo un cambio por otro aminoácido del mismo tipo en la posición 8 donde aparece una alanina en vez de una valina, ambos apolares. En cada una de las cepas no productoras de 1,3-pentadieno, se produce un único cambio de aminoácido: en la cepa Bch en la posición 443 aparece una asparagina (N)(polar) en vez de aspártico (D) (ácido) y en la cepa T2R una prolina (P) (apolar) en vez de treonina (T) (polar) en el residuo 462.

3.3 Análisis comparativo de la proteína Fdc1 de diferentes especies

Se ha realizado un alineamiento y comparación de la proteína Fdc1 de *S. cerevisiae* con las proteínas de otras especies capaces de descarboxilar sorbatos en 1,3-pentadieno, como *Aspergillus niger* (CAK38379.1) (Plumridge et al., 2008) y *Candida albicans* (XP_718068.1) (Stratford et al., 2007) junto a las proteínas de las especies *D. hansenii* y *Z. rouxii*. Los residuos conservados en todas las especies comparadas aparecen sobre un fondo rojo en la Figura 17.

Al analizar la estructura secundaria de las proteínas Fdc1 con la aplicación SWISS-MODEL, se obtuvo que, la proteína de *S. cerevisiae* presentaba un 100 % de identidad, la de *C. albicans*, *D. hansenii* y *Z. rouxii* entre un 61 y un 63 % y la de *A. niger* un 49 % con los modelos proteicos con código PDB 4S13 (estructura de la parte superior del alineamiento de la Figura 17 y Figura 18 izquierda) y 4ZAC (estructura de la parte inferior del alineamiento de la Figura 17). Ambos modelos se corresponden con la estructura propuesta para el monómero de la descarboxilasa dimérica de ácido ferúlico (Fdc1) de *S. cerevisiae*, descrita a partir de estudios cristalográficos por dos autores diferentes, Bhuiya et al., (modelo 4S13) y Payne et al., (modelo 4ZAC) en 2015. La proteína contiene tres dominios como se indica en la Figura 17, el primero encuadrado en verde, el segundo en morado y el tercero en naranja. En el dominio 2 y 3 se señalan los residuos catalíticos (en rectángulos grises) y los de unión a sustrato (rectángulos amarillos). En las cinco especies que se han alineado, los sitios catalíticos y de unión a sustrato están conservados a excepción de dos sitios de unión a sustrato en la posición 189-190 y 397-399, que son más variables. Concretamente en la posición 190, las cepas de *D. hansenii* y *Z. rouxii* contienen una metionina (M) en vez de una isoleucina (I) (ambos apolares), en la 397 *Z. rouxii* una metionina en vez de un aminoácido aromático como fenilalanina (F) o tirosina (Y) y en la 399 una treonina (T) (polar) en lugar de una isoleucina (I) (apolar) como *D. hansenii*.

El monómero de la proteína dimérica Fdc1 está formado por 13-16 α hélices, 22 láminas β y 7-9 hélices de tipo 3_{10} en función del modelo. Analizando los residuos de cada estructura en *D. hansenii* y *Z. rouxii*, encontramos que *Z. rouxii* es la que más residuos diferentes presenta, por ejemplo en las regiones $\alpha 6/\alpha 7$, $\beta 11$, $\beta 13$, $\alpha 7/\alpha 9$, sobre todo en $\alpha 9/11\alpha$ y le faltan dos residuos en $\eta 1$. Sin embargo, en estas zonas no se encuentran ninguno de los residuos importantes para la enzima anteriormente destacados.



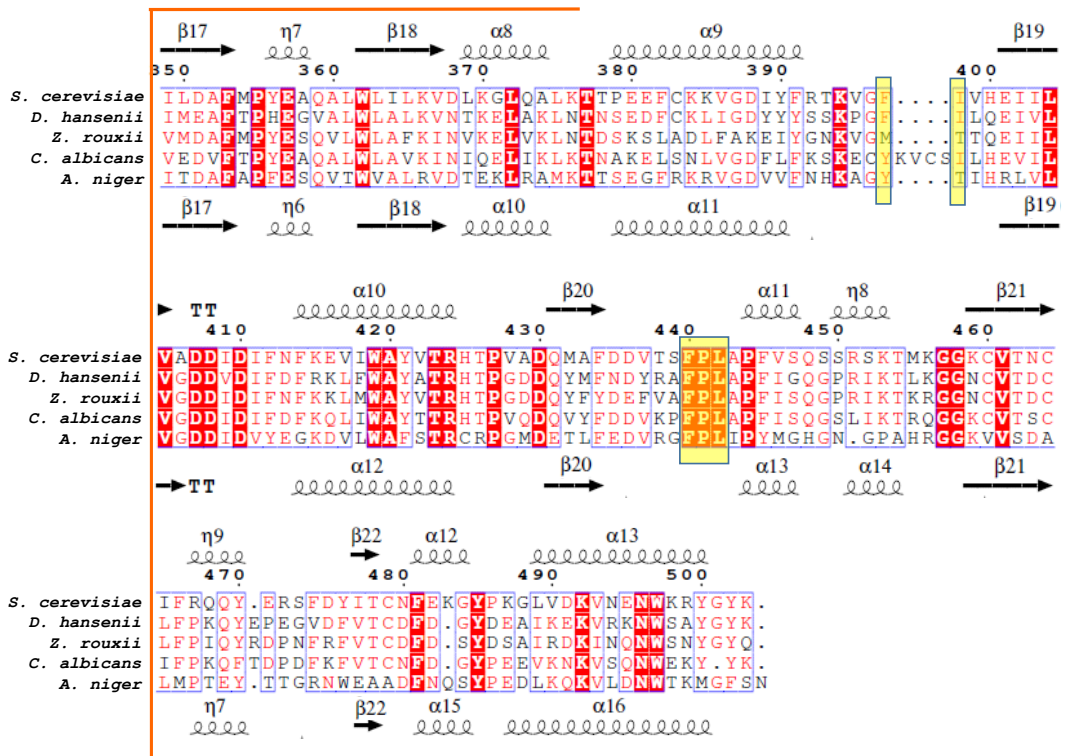


Figura 17. Alineamiento de las secuencias proteicas Fdc presentes en diferentes especies. Sombreados en rojo aparecen los residuos conservados y encuadrados con letras rojas los residuos similares. Los residuos dentro de rectángulos grises son residuos catalíticos y dentro de un rectángulo amarillo los implicados en la unión a sustrato (Bhuiya et al., 2015). Encima y debajo de los alineamientos aparecen marcados los residuos que forman las α hélices, las láminas β ó las hélices 3_{10} (η) y las siglas TT indican los giros β . La estructura que aparece encima del alineamiento se corresponde al modelo PDB 4S13 (Bhuiya et al., 2015) y en la parte inferior al modelo 4ZAC (Payne et al., 2015) pertenecientes a descarboxilasas de ácido ferúlico (Fdc1). Las regiones dentro del rectángulo verde, morado o naranja pertenecen a los dominios 1, 2 y 3 del monómero respectivamente descritos por Bhuiya et al., (2015).

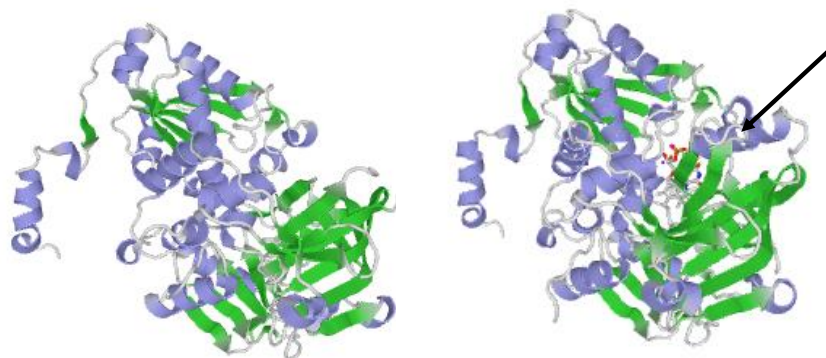


Figura 18. Estructura terciaria de las proteínas Fdc1 de *S. cerevisiae* tras su análisis con la aplicación SWISS-MODEL. La de la izquierda pertenece al modelo 4S13 de Bhuiya et al., (2015) y el de la derecha al modelo 4ZAC. La flecha indica la zona donde se incluye en el modelo 4ZAC una nueva α hélice, la $\alpha 5$.

Respecto a las cepas de *D. hansenii* no productoras de 1,3-pentadieno cabe destacar que la deleción de una Timina en el nucleótido 281 de la cepa PR 5, hace que se altere el marco de lectura de forma que su proteína Fdc1 se encuentra modificada a partir del final de la tercera α hélice y paralizándose la síntesis de la proteína poco después. En el resto de cepas no productoras, la CECT 10517, CBS 1792 y la J-12, la alteración del marco de lectura por la deleción en el nucleótido 383 ocasiona que a partir de la cuarta lámina β la proteína se encuentre alterada y se paralice su síntesis también poco después.

Por el contrario, la proteína Fdc1 de las cepas de *Z. rouxii* no presentaban ningún cambio aminoacídico significativo, solo un cambio de aminoácido en las cepas T2R al final de la hélice α 14, mientras que en la cepa Bch justo después de la lámina β 20 (estructura 4ZAC en la Figura 17), regiones que, como hemos comentado, no implican residuos importante en sí pero están bordeando una zona de unión a sustrato.

4. Desarrollo de un método molecular para la detección de cepas productoras de 1,3-pentadieno

En base a los resultados de secuenciación del gen *DhFDC1* de las cepas de *D. hansenii* y tras su alineamiento usando el programa ApE – A plasmid Editor, se diseñó un cebador (FDC_Dh_Pentadien) que abarcara la zona con cambio de base entre las cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno de la posición 127 (Figura 12), ya que como hemos comprobado, en esa posición en las cepas no productoras de 1,3-pentadieno aparece una A en vez de una G. Dicho cebador también contiene una Y que hibrida tanto con una C o T para poder captar también el cambio de base que tiene la cepa Tipo en posición 125. Junto con este cebador se ha empleado el cebador FDC1_Dh_Full_Rv diseñado en este trabajo para la amplificación del gen. El protocolo de PCR fue el utilizado para la amplificación de la región correspondiente al gen *PAD1* o *FDC1* pero a una temperatura de hibridación de 65,8°C considerada como la más adecuada para detectar únicamente amplificación en cepas productoras de 1,3-pentadieno.

Tras la aplicación de este protocolo de PCR en una selección de cepas de *D. hansenii* se obtuvo, como era de esperar, una amplificación de 130 pb en todas las cepas productoras de 1,3-pentadieno. Esto aparece reflejado en la Tabla 11 y Figura 19.

Tabla 11. Amplificación (+) o no (-) de la banda de 130 pb con los cebadores FDC1_Dh_Full_Rv y FDC1_Dh_Pentadien en una selección de cepas de *D. hansenii* productoras (azul) y no productoras (naranja) de 1,3-pentadieno. Las cepas no amplificadas presentan una mutación que les impide generar la proteína Fdc correcta.

Cepa	Amplificación
CECT 11369T	+
CECT 10026	+
CECT 10352	+
CECT 10378	+
CECT 10517	-
CBS 1792	-
CBS 1102	+
CYC 1265	+
CYC 1307	+
Es 4	+
J-01	+
J-09	+
J-11	+
J-12	-
J-15	+
J-16	+
J-17	+
CH 2	+
PR 5	-
PR 11	+
PR 13	+
EPEC 1.3	+
EPEC 4.E.2	+
29C1.2	+
29 Inf 1	+

+, amplificación
 -, no amplificación



Figura 19. Amplificación en cepas de *D. hansenii* con los cebadores FDC_Dh_Pentadien/ FDC1_Dh_Full_Rv. M: Marcador de peso molecular 100 bp. Líneas 1-9: cepas productoras de 1,3-pentadieno, CECT 11369^T; Es 4; EPEC 1.3; CECT 10352; CECT 10378; CYC 1265; CH2; J-09; 29Inf 1. Líneas 10-12: cepas no productoras de 1,3-pentadieno, CECT 10517; CBS 1792; PR 5. Línea 13: control negativo.

DISCUSIÓN

Desde que se descubrieron las propiedades del ácido sórbico como antimicrobiano en 1940 y se publicó la primera patente para su aplicación en alimentos y envoltorios por C. M. Gooding and Best Foods, Inc. (Gooding, 1945), su uso y el de los sorbatos como antifúngicos aumentó no solo en una gran variedad de productos alimenticios, sino también en comida para animales, fármacos y cosméticos (Stopforth et al., 2005). Las evaluaciones por parte de la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), JEDFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) y el SCF (*Scientific Committee on Food*) han hecho que sean considerados como uno de los conservantes más seguros y a su vez más efectivos de los autorizados como aditivos en la Unión Europea (EFSA ANS Panel, 2015). Su aplicación antimicrobiana, no obstante, como ya se ha comentado en la introducción, se ve mermada (Piper, 2011), entre otros mecanismos, por la capacidad de algunos microorganismos para descarboxilar los sorbatos con la producción del compuesto de olor desagradable, 1,3-pentadieno. Según la tarjeta de Seguridad Química Internacional del 1,3-pentadieno (CAS N° 504-60-9), a bajas concentraciones de este compuesto no se han notificado efectos adversos en humanos y, en estudios con animales, se ha determinado un bajo nivel de toxicidad aguda, pero ni genotoxicidad ni lesiones sistemáticas, a diferencia de otros conservantes (Gardner y Laurence, 1993; Nyman et al., 2007). Por lo que el problema de la presencia de 1,3-pentadieno en los alimentos no es sanitario, si no de índole económica.

En la mayoría de los estudios en los que se ha publicado este deterioro, se debía principalmente a hongos filamentosos y en pocos casos a levaduras. En este trabajo hemos profundizado en dos especies de levaduras, *D. hansenii* y *Z. rouxii*, descritas ya hace años en nuestro laboratorio como productoras de 1,3-pentadieno (Sensidoni et al., 1994; Casas et al., 1996, 1999, 2004).

La acción antimicrobiana del ácido sórbico y sus sales está ligada al pH, de forma que los pHs neutros o básicos favorecen las formas totalmente disociadas del conservante, y los pHs ácidos la forma sin disociar capaz de entrar en el interior celular por difusión simple y desencadenar las correspondientes alteraciones celulares (Liewen y Marth, 1985). En las industrias alimentarias se juega con el pH y la concentración del conservante, de forma que, a la vez que se inhiba el crecimiento microbiano no se alteren las características organolépticas propias del alimento. Aunque algunos autores (Stratford et al., 2007; Plumridge et al., 2008, 2010) realizan los estudios de descarboxilación de sorbatos a pHs ácidos, 4, y a una concentración de conservante más baja, 0,150 g/l; nosotros hemos seleccionado como condiciones para la determinación de 1,3-pentadieno, la concentración de 0,75 g/l a pH 7. Estas condiciones son modificaciones de la

prueba sensorial simplificada descrita por Casas et al., 1996, 1999 y Casas, (1999) y aúnan un buen crecimiento con producción de 1,3-pentadieno en poco tiempo (Tabla 5 y 6). Además, en un estudio previo desarrollado en nuestro laboratorio se determinó que a concentraciones superiores a 0,75 g/l, el crecimiento se veía retardado o inhibido (Fragoso, 2014). Aunque un pH cercano a 7 implica que menos de un 1 % del conservante es capaz de penetrar en el interior celular, es suficiente para generar 1,3-pentadieno detectable, como hemos podido comprobar y, a su vez, presenta la ventaja de requerir un menor tiempo de incubación. Por el contrario, a un pH alrededor de 5,6, próximo a los utilizados por Casas et al., (1996, 2004) y Casas, (1999), la cantidad del conservante que penetra en el interior celular es del 13 %, y esto produce inhibición del crecimiento en algunas cepas o retraso en otras. Por todo ello consideramos que las condiciones que hemos seleccionado son adecuadas para la detección rápida del compuesto de forma rutinaria en los laboratorios. Además, la comparación de los resultados de cromatografía con los de detección sensorial, ponen de manifiesto que la última en las condiciones seleccionadas puede ser una buena aproximación sencilla, independiente y económica para determinar la producción de 1,3-pentadieno en las diferentes cepas.

En esas condiciones, en las cepas de *S. cerevisiae* analizadas la producción de 1,3-pentadieno no supera el 1,6 % de conversión del sorbato potásico y en las de *Z. rouxii* el 0,8 %. Estos porcentajes de disociación tan bajos concuerdan con los descritos previamente, aunque en condiciones diferentes, para *S. cerevisiae* (Stratford et al., 2007) y *Z. rouxii* (Casas et al., 2004). A diferencia del género *Debaryomyces*, donde el porcentaje de conversión llega casi al 45 % y la cantidad de cepas capaces de producirlo es, al menos en las estudiadas, del 90 % en *D. hansenii* y del 100 % en *D. fabryi*. Esto estaría de acuerdo con lo descrito para *Aspergillus* sp., que es capaz de descarboxilar entre un 60 y un 100 % de estos ácidos (Plumridge et al., 2008, 2010; Stratford et al., 2012). Las diferencias entre especies podrían indicar la participación de mecanismos diferentes de represión del sistema, o diferente afinidad de sustrato por la enzima que (Stratford et al., 2007; Plumridge et al., 2008; Lin et al., 2015), en cualquier caso, habría que estudiar más profundamente.

Por otro lado, desde que se empezó a estudiar la base molecular de la producción de 1,3-pentadieno en levaduras, en todos los artículos anteriores al año 2015 se señalaba al gen *PAD1* (YDR538W) como el responsable de la codificación de la descarboxilasa que llevaría a cabo el único paso de descarboxilación no oxidativa entre los sorbatos y que conduce a la producción de 1,3-pentadieno en *S. cerevisiae*. Inicialmente la proteína Pad1 se estudió por su supuesta implicación en la descarboxilación, como su nombre indica, de ácidos fenilacrílicos, como el

ácido ferúlico, cumárico y cinámico (Clausen et al., 1994) que sintetizaban las plantas como agentes antimicrobianos naturales (Vanbeneden et al., 2008; Gu et al., 2011). A pesar de que el ácido sórbico y los sorbatos no son considerados ácidos fenilacrilícos puesto que no poseen un anillo aromático, se supuso que su estructura reunía las características necesarias para ser un sustrato de la enzima Pad1 de *S. cerevisiae* (Stratford et al., 2012). Al mismo tiempo, ha existido y existe mucha controversia y confusión entre el papel de esta enzima con las descarboxilasas de ácido fenólico y cuyas siglas son iguales (Pad). Una vez analizada la bibliografía, podemos decir que de forma general las bacterias contienen principalmente descarboxilasas de ácidos fenólicos (Pad) y las levaduras y algunas bacterias como *E. coli* o *P. aeruginosa*, descarboxilasas de ácidos fenilacrilícos como la proteína Pad1 de *S. cerevisiae*. Ambas tienen secuencias aminoacídicas parecidas pero las primeras son proteínas diméricas y no requieren cofactores para su actividad y las segundas son proteínas dodecaméricas en las que se asumía que requerían FMN como cofactor. Aún así, salvo excepciones, los dos tipos de descarboxilasas pueden usar cumárico, ferúlico y cinámico (Jung et al., 2013; Bhuiya et al., 2015). Además, los escasos autores que han estudiado la presencia de genes homólogos del gen *PAD1* de *S. cerevisiae* en otras levaduras, entre ellas las estudiadas en esta Tesis, concluyeron que *Z. rouxii* no presentaba dicho gen (Stratford et al., 2007). Sin embargo, como reflejan nuestros resultados tanto en *D. hansenii* como en *Z. rouxii* hemos identificado secuencias similares al gen *PAD1* de *S. cerevisiae*.

Con respecto a las variaciones nucleotídicas que pudieran justificar que unas cepas fueran productoras y otras no productoras de 1,3-pentadieno hemos encontrado diferencias con lo publicado en *S. cerevisiae*. En esta levadura, las células implicadas en la fabricación de sake, shochu, vino o cerveza, incapaces de descarboxilar ácido ferúlico en 4-vinilguaiacol presentan en posiciones comunes, sustituciones de nucleótidos, conservativas o no en la cadena de aminoácidos. Lo más destacable en dos estudios independientes es que en todas las cepas de fermentación alta de *S. cerevisiae* incapaces de descarboxilar el ácido ferúlico, aparece una sustitución nucleotídica común en la posición 305 que origina un codón STOP, truncando la proteína desde la posición 102 (Mukai et al., 2014; Chen et al., 2015). En *D. hansenii* a pesar de que las cepas no productoras tienen en varias posiciones la misma sustitución de nucleótidos, el cambio nucleotídico en la posición 158 que da lugar a un cambio de aminoácido en posición 53 (arginina), según nuestros resultados no estaría ligado a la incapacidad de algunas cepas de producir 1,3-pentadieno, como comentaremos más adelante. En *Z. rouxii* no hemos detectado ningún cambio en la secuencia nucleotídica entre cepas productoras y no productoras de 1,3-

pentadieno en su gen Pad1. Por tanto, en ambas levaduras hemos podido comprobar que no existen cambios en este gen que justifiquen las diferencias encontradas entre cepas.

La estructura secundaria de la proteína Pad es consecuente con dos modelos de la proteína UbiX descrito en bacterias, el modelo PDB 1SBZ de la proteína de *E. coli* y el modelo 4ZAN de la de *P. aeruginosa*. Esta proteína está implicada en uno de los pasos de descarboxilación durante la síntesis de la coenzima Q en un amplio rango de bacterias y se considera una proteína ortóloga de la proteína Pad1 de *S. cerevisiae*, con la que presenta un 50 % de identidad ($E=2e-64$) (Gulmezian et al., 2007). Estos dos modelos son muy similares y se corresponden con el pasado y el presente de la función de la proteína Pad.

El modelo de la proteína Pad/UbiX de *E. coli* proviene del estudio cristalográfico realizado en 2004 en donde se compararon las proteínas Pad de diferentes microorganismos como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* y *Streptomyces coelicolor*, entre otros. A su vez se dedujeron una serie de residuos conservados en todas ellas e implicados en la dimerización, en la unión a sustrato o en la unión al cofactor FMN (*Flavin mononucleotide*) (Rangarajan et al., 2004). Las enzimas Pad/UbiX de *E. coli* o *S. cerevisiae* se clasificaron originariamente como dependientes de FMN pertenecientes a la familia HFDC (*Homo-Dodecameric Flaving containing Cysteine Decarboxylase*), aunque siempre fueron consideradas bastante diferentes a las de esta familia porque no mostraban similitud de secuencia con ellas y porque tenían motivos de unión a sustrato y acceso del cofactor FMN diferentes (Rangarajan et al., 2004; Li et al., 2013). El modelo de la proteína Pad/UbiX de *P. aeruginosa*, mucho más reciente, proviene del estudio cristalográfico realizado por White et al., (2015). En este trabajo se revelaron una serie de residuos, la mayoría coincidentes con los detectados por Rangarajan et al., (2004), más otros nuevos que estaban implicados en la función real descubierta para esta enzima, la de producir un cofactor nuevo derivado de flavina necesario para el paso de descarboxilación por la proteína UbiD/Fdc en la síntesis de ubiquinonas (Lin et al., 2015). Estos residuos aparecen dentro de rectángulos grises en la Figura 10 y están implicados en la unión de la proteína al fosfato del DMAP (dimetilalil monofosfato), ruptura del fosfato del resto dimetilalil o en su posterior unión y reducción del FMN (White et al., 2015).

Según la modelización que hemos realizado, la función de las proteínas Pad de *D. hansenii* y *Z. rouxii* en principio no mostraría ninguna alteración porque, en primer lugar, presentan todos los residuos importantes señalados por los dos modelos proteicos para la función de la enzima. En segundo lugar, porque el cambio de base que ocurre en algunas cepas de *D. hansenii* en el

aminoácido número 53 ocurre en una zona de residuos no conservados ni implicados en formar las regiones α o β de la misma. Y en tercer lugar, la variabilidad que puede existir en la región α_3 y β_3 de estas especies también se aprecia en las otras especies de levaduras alineadas.

En la búsqueda de una respuesta de por qué la enzima descrita por todos los autores como la responsable del paso de descarboxilación, sin tener cambios significativos en su secuencia aminoacídica, no producía 1,3-pentadieno en algunas cepas, nuestra primera hipótesis fue que quizás las diferencias se encontraran a nivel de expresión del gen y lo estudiamos en *D. hansenii*. Se confirma que la expresión del gen *DhPAD1* en *D. hansenii* no se induce significativamente por la presencia del ácido, como se ha descrito también en *S. cerevisiae* (Stratford et al., 2007) y además, que también hay expresión en la cepa PR5 no productora de 1,3-pentadieno pero sin diferencias significativas respecto al resto de cepas productoras analizadas. Chen et al., (2015) también observó síntesis de la proteína Pad1 en algunas cepas no productoras de 4-vinilguaicol de *S. cerevisiae*, pero no en aquellas que contenían un codón STOP prematuro en la secuencia *PAD1*.

Teniendo en cuenta que algunos autores no encontraron actividad descarboxilasa de la proteína Pad al superexpresarla en *E. coli* (Rangarajan et al., 2004; Mckenna y Nielsen, 2011) y además, que cuando clonamos el gen *DhPAD1* de la cepa CECT 11369^T en la cepa de *S. cerevisiae* Δ PAD1 bajo el promotor constitutivo del gen *ADH1*, no aumentaba de forma significativa la producción de 1,3-pentadieno (datos no mostrados), empezamos a considerar como una segunda hipótesis, la posible existencia de alguna otra enzima responsable del proceso de descarboxilación.

Stratford et al., en 2007 fue el primer autor en atribuir la producción de 1,3-pentadieno a la proteína Pad1 porque observó que la delección del gen impedía la descarboxilación del ácido sórbico y del cinámico y además, se correspondía con la capacidad descarboxilasa que se restauraba al introducir este gen en cepas de *S. cerevisiae* sensibles a ácido cinámico descrita por Clausen et al., en 1994. El mayor error fue seguir manteniendo que dicha enzima tenía actividad descarboxilasa sin todavía haberse demostrado completamente, tanto en esos estudios como en otros posteriores donde ya se intuía. Posteriormente otros autores descubrieron que para que se dé la descarboxilación de los ácidos fenilacrílicos en *S. cerevisiae* se requiere de la expresión tanto del gen *PAD1* como del gen adyacente *FDC1* (*Ferulic acid DeCarboxilase gene*, anteriormente llamado *OHB1* o descarboxilasa de ácido 4-hidroxibenzoico) (Mukai et al., 2010; Richard et al., 2015), aunque no se conocía la función exacta de este último en el proceso (Mukai et al., 2010; Plumridge et al., 2010).

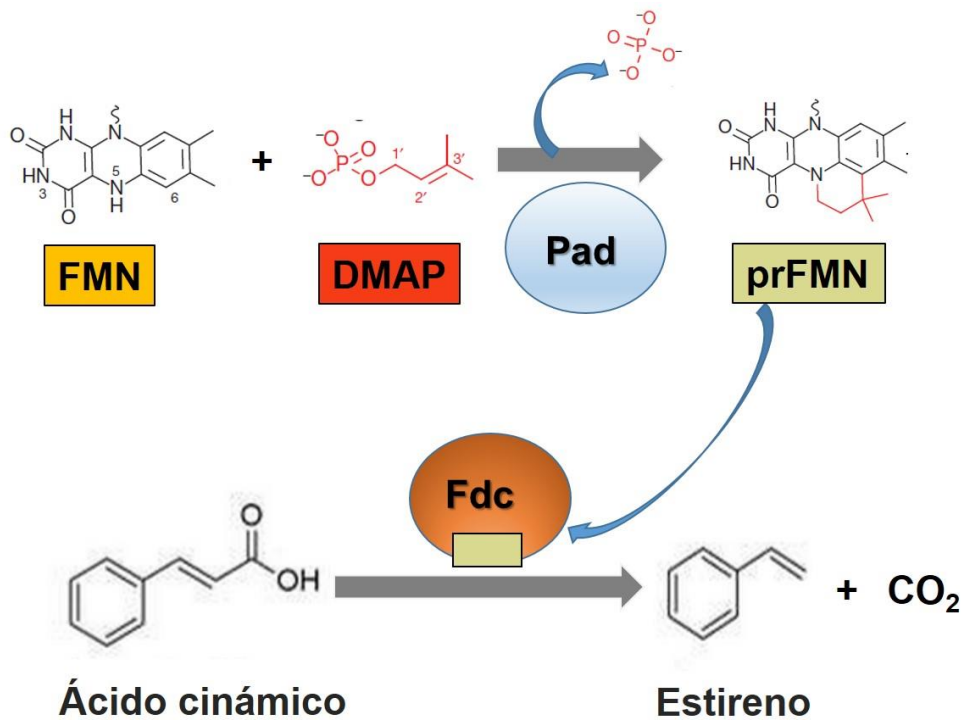


Figura 20. Esquema del funcionamiento del sistema de descarboxilación formado por las enzimas Pad1 y Fdc1. Pad catalizaría la reacción entre FMN y DMAP para la formación de un cofactor nuevo y difusible, una forma prenilada de FMN, necesario para la enzima Fdc, la cual posee la actividad descarboxilasa de compuestos aromáticos y alifáticos (Modificación de Lin et al., 2015 y White et al., 2015).

Los resultados de la clonación y expresión de los genes *PAD1* y *FDC1* de *S. cerevisiae* (Lin et al., 2015) y las proteínas bacterianas de *E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa* UbiX y UbiD ortólogos de las proteínas Pad1 y Fdc1 pero implicadas en la síntesis de ubiquinona (Payne et al., 2015; White et al., 2015), junto a otros estudios publicados a partir del año 2015, han ayudado a entender cómo ocurre el proceso de descarboxilación. En primer lugar, las enzimas Pad1 o UbiX, al contrario de lo que había sido publicado hasta el año 2015, no actuarían como descarboxilas, sino que su actividad se centraría en catalizar la formación de un cofactor nuevo y difusible, necesario para la enzima Fdc1/UbiD, la cual sí que tiene la verdadera actividad descarboxilasa (Lin et al., 2015). La enzima Pad1/UbiX actuaría como una flavinpreniltransferasa, requiriendo dimetilalil monofosfato (DMAP) como sustrato y su función sería la de romper el resto fosfato del DAMP, para unir el dimetilalil resultante a la flavina del cofactor FMN. Así se crea un cuarto anillo no aromático en el cofactor FMN (Figura 20), que pasa a estar reducido y prenilado (White et al., 2015). Este cofactor FMN modificado, que se activa posteriormente por oxígeno, es el que

necesita la enzima Fdc1/UbiD para ejercer la verdadera actividad de descarboxilación (Payne et al., 2015). De esta forma se resuelve parcialmente el enigma de cómo ocurre verdaderamente el proceso de detoxificación de los ácidos fenilacrílicos y del ácido sórbico, al mismo tiempo que se deberá hacer una correcta reclasificación de las descarboxilasas que actúan sobre ellos.

En estos últimos trabajos ya se propone renombrar a la enzima Pad1 con el nombre de *Flavin Prenyltransferase* en vez de *Phenylacrylic Acid Decarboxylase* ya que no posee actividad descarboxilasa (Payne et al., 2015; White et al., 2015). El cofactor FMN prenilado es tan novedoso que muchas de las publicaciones posteriores se centran en averiguar exactamente cómo es y cómo ocurre su implicación en el proceso de descarboxilación (Payne et al., 2015; White et al., 2015; Beveridge et al., 2016; Ferguson et al., 2016; Lan y Chen, 2016). En nuestro trabajo, por tanto, confirmamos que la expresión del gen *PAD1* por si sola no es suficiente para justificar la descarboxilación, ya que estas proteínas tanto en las cepas de *D. hansenii* como en las de *Z. rouxii* analizadas no presentan ninguna anomalía para poder sintetizar el cofactor necesario para la enzima Fdc (Lin et al., 2015; White et al., 2015).

En el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *FDC1* que codifica para la verdadera descarboxilasa, hemos descubierto que en *D. hansenii* el gen *DhFDC1* tiene muchos más polimorfismos que el gen *DhPAD1*, cambios que podrían estar relacionados con la mayor actividad descarboxilasa de esta enzima frente a la observada por cromatografía en *Z. rouxii* o *S. cerevisiae*. Las cepas no productoras de 1,3-pentadieno de *D. hansenii* contienen polimorfismos comunes en todas ellas, pero el polimorfismo más crítico lo marcan las deleciones comunes que conllevan a la aparición de un codón STOP que trunca la proteína Fdc1 e impide la descarboxilación de sorbatos en esas cepas.

Se han descrito también polimorfismos del gen *FDC1* comunes entre todas las cepas de *S. cerevisiae* incapaces de producir 4-vinilguaiacol, otros comunes entre cepas aisladas de sake y shochu, otros en todas las levaduras de fermentación alta y otros comunes en levaduras de fermentación alta y baja. Las cepas de fermentación alta y baja contienen dos posibles mutaciones comunes que impiden la descarboxilación del sistema por la aparición de un codón STOP en la proteína, bien por un cambio de nucleótido en la posición 460 del gen en cepas de fermentación alta, o bien por la inserción de una Adenina en la 501/502 en todas las cepas de fermentación alta y baja. Del mismo modo, las cepas de sake y shochu que no producen 4-vinilguaiacol comparten una mutación sin sentido en la posición 160 que desemboca en un codón STOP prematuro (Mukai et al., 2014; Chen et al., 2015). En esos estudios de *S. cerevisiae*,

la incapacidad de producir 4-vinilguaiacol es debido a mutaciones sin sentido o inserciones en la región *FDC1* sumado o no a mutaciones sin sentido en el gen *PAD*. Sin embargo, en comparación con *S. cerevisiae*, al menos en las cepas analizadas de *D. hansenii* en nuestro estudio, la incapacidad de producir 1,3-pentadieno la marcan las deleciones en el gen *FDC1*. *A priori* estas mismas cepas de *S. cerevisiae* incapaces de descarboxilar el ácido ferúlico tampoco serían capaces de descarboxilar sorbatos y sería muy interesante su confirmación.

La estructura secundaria de la proteína Fdc tanto de *D. hansenii* como *Z. rouxii* se corresponde con la proteína de estructura dimérica de *S. cerevisiae* propuesta por dos autores diferentes, el modelo 4S13 y el 4ZAC (Bhuiya et al., 2015; Payne et al., 2015). Las únicas diferencias más importantes entre ellos son que el modelo de Payne incluye en la estructura tres α hélices de más, la $\alpha 5$, la $\alpha 8$ y $\alpha 9$ son dos en vez de la $\alpha 7$ del otro modelo y la $\alpha 14$, que en el modelo de Bhuiya se identifica como $\eta 8$. Cada monómero de la proteína a su vez está formado por tres dominios. El dominio 3 se encarga de la dimerización formando un bolsillo hidrofóbico entre los dos monómeros, donde se sitúa el sustrato ayudado por un loop formado por la hélice C-terminal. En el dominio 2 están los residuos catalíticos y, tanto en el 2 como en el 3, los implicados en la unión a sustrato, algunos de ellos variables (Bhuiya et al., 2015). El dominio 2 es donde se localizan las mutaciones que truncan la proteína en las cepas de *D. hansenii* que hemos analizado (Figura 17) como en las descritas en cepas de *S. cerevisiae* de fermentación alta y baja (Mukai et al., (2014) y Chen et al., (2015) (las de sake y shochu en el dominio 1)). De forma que, la posible proteína que se almacene, si no actúa el sistema que reconoce y lleva a degradación los RNA mensajeros con codones de terminación prematuros (Brojna y Wen, 2009), no presentarían ninguna capacidad catalítica. En *A. niger*, la baja identidad de su proteína Fdc con esos dos modelos proteicos ha llevado al establecimiento de su propio modelo con el código PDB 4ZA4 (Payne et al., 2015).

Como excepción a los resultados obtenidos para *D. hansenii* hay que destacar que en la cepa CBS 766 se pudo amplificar el gen *DhPAD1* con los mismos cebadores empleados para el resto de cepas de *D. hansenii* observándose muchos más polimorfismos que en el resto de ellas. Sin embargo, no obtuvimos amplificación con los del gen *DhFDC1* y por tanto no podemos determinar qué es lo que ocurre en ella para no producir 1,3-pentadieno. De esta forma también se pone de manifiesto, las características especiales de esta cepa que llevaron a otros autores a considerar que se trate de una cepa de otra especie (Gente et al., 2007).

Con respecto a *Z. rouxii*, al contrario de los resultados publicados por Stratford et al., (2007), los resultados de este capítulo como los descritos hace años en nuestro laboratorio por Casas et al.,

en 1996, 1999 y 2004 corroboran que *Z. rouxii* puede producir 1,3-pentadieno. De las cepas analizadas en este trabajo, únicamente el 17 % de ellas era capaz de generarlo. Sin embargo, la ausencia de mutaciones significativas en sus proteínas Pad1 y Fdc1 nos han impedido encontrar el posible motivo genético de esta diferencia, el cual había que estudiar más a fondo, pero parece indicar que implicaría un mecanismo diferente al de *D. hansenii* y otras especies. Esta especie es muy osmotolerante porque se aísla con mayor frecuencia de alimentos con una baja actividad de agua debido al alto contenido en azúcar (Martorell et al., 2007). Esta habilidad podría estar influenciando en la capacidad productora de 1,3-pentadieno, ya que en el estudio de Casas et al., (1996), la mayoría de las cepas aisladas de mazapán producían 1,3-pentadieno cuando se reinoculaban en mazapanes y las mismas lo podían producir o no en medios experimentales a unas condiciones concretas de pH o concentración de azúcar.

Se sugiere que el sistema de descarboxilación del que forma parte las proteínas Pad/Fdc no es un sistema esencial para la viabilidad celular, pero sí confiere ventajas durante la germinación de esporas de hongos ante la inhibición natural de los ácidos fenilacrílicos de las plantas y, a la hora de crecer invadiendo fruta en decaimiento, que suele ser rica también en estos ácidos (Clausen et al., 1994; Stratford et al., 2012). Por tanto, la producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos sería la consecuencia de la utilización de esta vía natural que habría aparecido evolutivamente mucho antes que la humanidad empezara a utilizar sorbatos como conservante. De hecho, las nuevas investigaciones especifican que la enzima Fdc con ayuda del cofactor FMNpr cataliza la descarboxilación de ácidos carboxílicos α - β insaturados porque es en ese enlace donde se produce el ataque (Payne et al., 2015; Lan et al., 2016). Entonces, tantos son los sustratos que se le pueden atribuir, que el sistema de descarboxilación Pad/Fdc podría funcionar como un sistema con una gran promiscuidad de sustratos. A nivel industrial, las descarboxilasas son enzimas muy importantes por su implicación en procesos de síntesis de importantes compuestos químicos (Kourist et al., 2014), especialmente las descarboxilasas de ácidos aromáticos para el establecimiento de procesos medioambientalmente sostenibles con los que obtener actuales derivados del petróleo a partir de fuentes renovables. Concretamente el sistema de descarboxilación Pad/Fdc forma parte de dos patentes publicadas en el año 2015 en las que se establece un método para producir alquenos y estireno (en la fabricación de plásticos, adhesivos y resinas) con la utilización de microorganismos modificados genéticamente que incluyan las enzimas del sistema Pad/Fdc (Leys et al., 2015; Nielsen y Mckenna, 2015).

Por otro lado, teniendo en cuenta que *D. hansenii* es una levadura que también se considera de interés industrial por las características organolépticas que confiere a diferentes productos

como los quesos y el jamón por ejemplo (Andrade et al., 2010; Padilla et al., 2014), ha sido también uno de nuestros objetivos desarrollar un protocolo de PCR que diferencie entre cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno. Aprovechando las mutaciones que presentan en común las cepas de *D. hansenii* no productoras de 1,3-pentadieno, hemos podido comprobar que la utilización de los cebadores FDC_Dh_Pentadien/FDC1_Dh_Full_Rv que recogen la mutación en la posición 127 podrían suponer una prueba efectiva, menos laboriosa y más rápida que la detección sensorial del 1,3-pentadieno en esta especie. Consideramos que sería útil comprobar cuando se trata de seleccionar cepas para su utilización como cultivos iniciadores o para el seguimiento de cepas contaminantes en fábricas.

CAPÍTULO 3

Utilización de tecnología MWIR para la detección de la capacidad deteriorante de levaduras por producción de 1,3-pentadieno y CO₂

INTRODUCCIÓN

Para identificar el/los compuestos causantes del rechazo de los alimentos por los consumidores debido a malos olores y sabores, en algunas investigaciones se procede a realizar como primer paso un análisis sensorial estricto. Sin embargo, debido a la duración y el alto coste del mismo, en la mayoría de las industrias únicamente proceden a la olfacción de las muestras por parte del personal experto para confirmar la presencia de un olor alterado. Así se genera una información descriptiva adecuada (descriptores) para que, con muestras controles y afectadas, se proceda a hacer el análisis químico oportuno y se confirme la identidad y el nivel del compuesto(s) responsable(s) (Saxby, 1993; Kilcast, 2003; Ridgway, 2015). Como la mayor parte de los compuestos causantes de malos olores y sabores en los alimentos son percibidos inicialmente de forma olfativa al ser compuestos volátiles, la cromatografía de gases suele ser la técnica química más elegida para su identificación (Ridgway, 2015).

Para el análisis químico de los volátiles de alimentos o bebidas, en muchos casos se necesita una preparación previa de la muestra, que va a depender de la naturaleza, cantidad de la muestra, así como del umbral sensorial de compuesto que se quiere detectar (Ridgway, 2015). El análisis directo y estático del espacio de cabeza de muestras de alimentos es la técnica más útil para ver las diferencias entre las muestras “buenas” y las “malas”, en cualquier tipo de matriz o alimento y no necesita el empleo de solventes (Reid, 2003). De esta forma se han analizado los volátiles producidos por ciertos hongos en mermelada de fresa (Nieminen et al., 2008) y la presencia de estireno o 1,3-pentadieno producido por hongos y levaduras en margarina, queso y mazapanes (Sensidoni et al., 1994; Casas et al., 2004; Pinches y Apps, 2007). Para aumentar la sensibilidad de este sistema, en algunos casos se emplea la técnica de espacio de cabeza dinámico para concentrar los volátiles en una trampa con fases de sorción y extraerlos después con una desorción térmica o solventes (Reid, 2003), como en la detección de geosmina y 2,4,6-tricloroanisol en agua y otros volátiles en vino (Huck et al., 1995; Salemi et al., 2006; Bosch-Fusté, et al. 2007), 1,3-pentadieno en queso (Horwood et al., 1981) o trimetilarsina en crustáceos (Whitfield et al., 1983).

Sin embargo, debido a la baja concentración de los compuestos responsables de malos olores o sabores en el espacio de cabeza, en muchos casos se recurre a algún método de extracción previo a su análisis por solventes o por métodos más modernos de extracción en fase sólida (Ridgway et al., 2010).

En este capítulo vamos a repasar inicialmente las principales técnicas químicas empleadas para la detección de volátiles, centrándonos finalmente en la descripción de la espectroscopía de infrarrojos medio (MWIR) como propuesta para detectar 1,3-pentadieno.

1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una de las técnicas más utilizadas para separar los aromas de los alimentos. Para ello se utiliza un cromatógrafo de gases (GC) en el cual las muestras se inyectan en el inyector de la cabeza de la columna cromatográfica, donde se vaporizan y se disuelven en un gas inerte o portador que les hará circular y separarse en los diferentes componentes en la columna cromatográfica en función de su fuerza de unión (adsorción, exclusión, cambio iónico, afinidad) con la fase estacionaria de la que se encuentra rellena. Los componentes irán eluyendo a diferentes tiempos de la misma (tiempo de retención de un compuesto) hasta llegar a un sistema de detección (Figura 1). En cromatografía de gases se usan columnas capilares de sílice fundido dentro de las cuales se sitúa la fase estacionaria. Cuanto más largas sean, mejor será la separación de compuestos (Elmore, 2015).

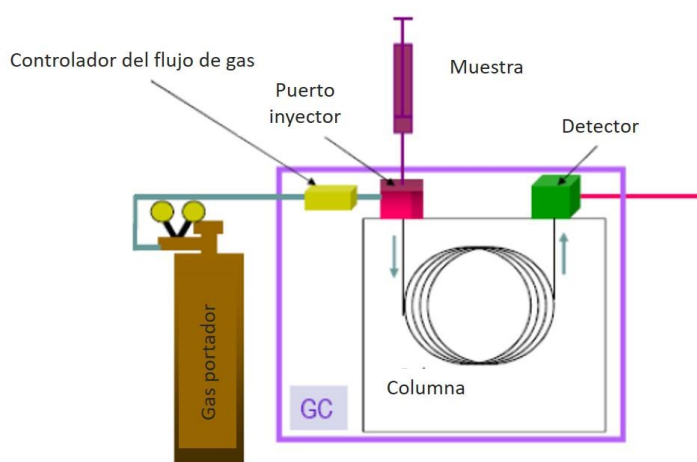


Figura 1. Esquema de las partes de un cromatógrafo de gases. Modificación de Bhardwaja et al., (2016).

Los detectores que se emplean para volátiles pueden ser universales, que normalmente responden ante cualquier compuesto, o específicos frente a un número limitado de compuestos. Entre los primeros están el detector de conductividad térmica (TCD, *Thermal Conductivity Detector*), de ionización de llama (FID, *Flame Ionization Detector*), de captura electrónica (ECD, *Electrón-Capture Detector*) o el más reciente de emisión atómica (AED, *Atomic Emission Detector*) (Miller, 2005). De entre los específicos, destaca el detector fotométrico de llama pulsado o no (FDP, PFDP, *Pulsed Flame Photometric Detector*) empleado en compuestos que contengan fósforo o azufre, los cuales se han utilizado mucho para compuestos de azufre en vinos comerciales, como sulfuro de hidrógeno, metanetioli o

metiltioacetato hasta niveles de ppm (Mestres et al., 2000; Fang y Qian, 2005; Patrignani et al., 2016), o dimetil sulfuro en distintos tipos de leche (Vazquez-Landaverde et al., 2006).

Variaciones de la técnica cromatografía, como son la cromatografía de gases ultrarrápida (UFGC, *Ultra-Fast Gas Chromatography*) y la cromatografía de gases multidimensional (MDGC, *Multidimensional Gas Chromatography*), permiten aumentar la velocidad de separación la primera (Rubiolo et al., 2014) o aumentar la capacidad resolutoria cromatográfica la segunda, muy empleadas para un exhaustivo análisis del aroma de alimentos (Marriott et al., 2012) como el vino (Robinson et al., 2011).

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), a excepción de su utilización en compuestos de alto peso molecular o polares, no se suele emplear con la mayoría de los compuestos responsables de sabores y olores ya que suelen tener buena resolución con la cromatografía de gases (Reid, 2003).

1.1 Cromatografía de Gases-Olfatometría

La Cromatografía de Gases-Olfatometría o GC-O (*Gas Chromatography-Olfatometer*) es una técnica en la que los compuestos se separan por cromatografía de gases y posteriormente pasan de forma separada por un detector olfatométrico, que consiste en un puente nasal o máscara humedecida donde un asesor o panelista entrenado señalará el tiempo, intensidad y descriptor del olor (Elmore, 2015). Esta técnica es útil como paso inicial de *screening* de volátiles o para confirmar la presencia de un compuesto específico en una muestra (Ridgway et al., 2010). La técnica GC-O ha sido utilizada en innumerables estudios para identificar y comparar los compuestos responsables del aroma y de malos olores en bebidas alcohólicas (La Guerche et al., 2006; Plutowska, y Wardencki, 2008), leches y quesos (Rychlik y Bosset, 2001; Zellner et al., 2008), carnes (Machiels et al., 2004; Dang et al., 2016), café (Akiyama et al., 2003), zumos y frutas (Ruiz Pérez-Cacho et al., 2007).

1.2 Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (GC-MS)

La combinación de la cromatografía de gases para la separación de compuestos, acoplada a espectrometría de masas como detector de los mismos (GC-MS), es la herramienta combinada más utilizada para el análisis de compuestos volátiles orgánicos (Reid, 2003). El detector más común es un cuadrupolo donde los compuestos se bombardean con una corriente de electrones a 70 eV, lo cual hace que se ionicen o fragmenten hasta dar su espectro de masa característico

que va a ser identificado mediante librerías específicas. También existen otros tipos de analizadores de masa basados en trampas de iones, tiempo-de-vuelo y Orbitrap (Moeder, 2014). El rango adecuado para la adquisición de datos por GC-MS durante el análisis de compuestos del aroma, es el escaneo desde 300 hasta 29 m/z (relación masa/carga) (Elmore, 2015).

El espectro de masa de los compuestos puede ser adquirido por dos modalidades, barrido completo (*full scan*) o TIC (*Total Ion Chromatogram* o suma total de todas las abundancias de todas las masas de la muestra) donde se obtiene todo el espectro de masas de todos los componentes de la muestra y, por otro lado, la monitorización de iones determinados o SIM (*Selected Ion Monitoring*), donde se analizan selectivamente iones característicos de los compuestos presentes en la muestra (Reid, 2003). El primero de ellos se suele emplear en análisis cualitativos para la identificación de compuestos desconocidos por búsqueda en bibliotecas. El segundo, al analizar únicamente un pequeño número de iones, mejora la sensibilidad y se suele emplear en la identificación y cuantificación de compuestos conocidos (Moeder, 2014). Las dos librerías más comunes para identificar los compuestos por su espectro de masa son NIST/EPA/NIH *Mass Spectral Library* (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>) y el software de Wiley Registry 10th Edition/NIST 2012 *Mass Spectral Library* (Elmore, 2015).

Cuando la descripción sensorial no aporta suficiente información o cuando el compuesto es desconocido, se usa un *screening* (barrido) inicial como primer paso para el análisis, que normalmente implica la comparación de perfiles de volátiles por GC-MS entre un control y una muestra problema y la identificación de los diferentes picos cromatográficos que presenten mediante una búsqueda en librerías espectrales (Ridgway et al., 2010; Ridgway y Lalljie, 2011).

Además de la identificación de compuestos, la cuantificación es otra de las tareas de los equipos de GC-MS. Una cuantificación simple es la integración de todos los picos de los cromatogramas y señalar cada pico como un porcentaje relativo del área total de todos los picos cromatográficos (Elmore, 2015). Las técnicas como el análisis de isótopos estables, curvas de calibrado del compuesto de interés o adición de estándares, pueden ser utilizadas para lograr una mejor cuantificación o una semi-cuantificación del compuesto de interés por GC-MS (Moeder, 2014).

2. Narices electrónicas o sensores químicos de gases

La aplicación de un análisis sensorial e instrumental suele ser impensable en cantidad de evaluaciones de alimentos y bebidas debido a su elevado coste, el tiempo que conlleva,

compleja interpretación de resultados y la necesidad de transporte. Esto ha dado lugar a que muchas investigaciones desde mediados de los años 90 del siglo pasado se centren en reemplazar la tecnología GC y el análisis sensorial, por la implantación en la industria alimentaria de sistemas de olfacción o gustación como narices o lenguas electrónicas (Wyszynski y Nakamoto, 2015), los cuales son de menor coste, más simples y proporcionan resultados más rápidos (Smyth y Cozzolino, 2012).

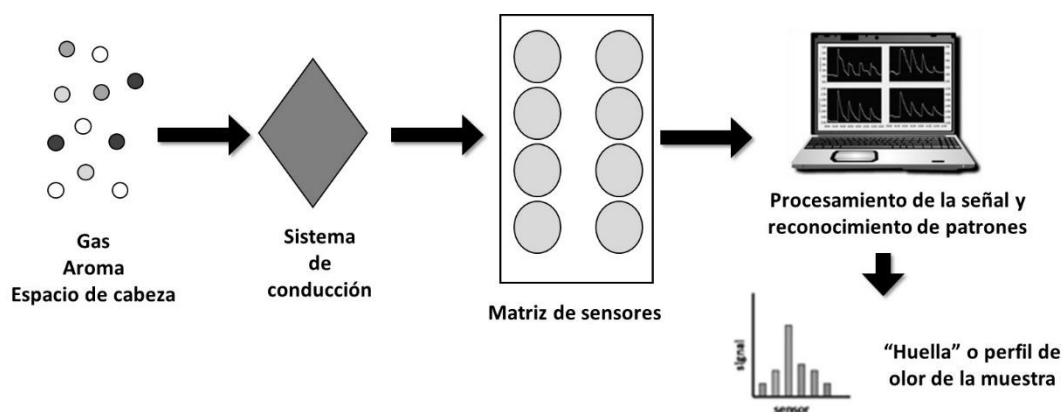


Figura 2. Representación esquemática de los componentes de una nariz electrónica.

Estos dispositivos están compuestos (Figura 2) por un sistema de conducción que extrae el aroma o un sistema de flujo de aire que conduzca la muestra hasta la matriz de sensores o receptores con diferentes propiedades superficiales (Reid, 2003). Cada sensor químico está formado por una capa sensorial y una transductora que interacciona con el compuesto químico produciendo un cambio físico o químico en la primera generando una señal eléctrica medible o modificación de la segunda (Deisingh et al., 2004). Al final existe un sistema de procesamiento de la señal y reconocimiento de patrones, el cual, analizará todas las señales generadas por el espacio de cabeza y obtendrá al final una clasificación, perfil de olor o “huella” de la muestra (Ridgway et al., 2010; Wyszynski y Nakamoto, 2015).

2.1 Tipos de sensores y procesamiento de la señal-reconocimiento de patrones

Los sensores químicos que se utilizan en narices electrónicas suelen ser sensores no específicos o semiespecíficos organizados en matrices que responden a grupos de compuestos químicos más que a uno específico (Reid, 2003; Wyszynski y Nakamoto, 2015). Los sensores pueden ser de óxidos metálicos (MOX, *Metal Oxide*), polímeros orgánicos conductores o polímeros

intrínsecamente conductores (Loutfi et al., 2015), respondiendo a cambios en su resistencia o conductividad por interacción con moléculas odorantes. También existen los sensores gravimétricos sensibles a cambios de masa durante la interacción con las moléculas odorantes, como el QCM (*Quartz Cristal Microbalance*) o el SAW (*Surface Acoustic Wave*) (Correa Hernando, et al., 2005; Wyszynski y Nakamoto, 2015). Los sensores de óxidos metálicos tienen una vida útil elevada y son los sensores más usados en aplicaciones en alimentos y bebidas (Loutfi et al., 2015), dominando en la identificación de malos olores de los mismos (Reid, 2003). Existen también sensores ópticos (McDonagh et al., 2008) y sensores colorimétricos (Rakow y Suslick, 2000; Chen et al., 2013).

Una vez que ha pasado la muestra por los sensores, cada sensor dará un valor de intensidad de respuesta, obteniéndose una matriz o vector de datos a analizar computacionalmente de diferentes formas. En primer lugar, se puede realizar una representación gráfica por barras (Gráfico de Figura 2) o radial de los mismos y obtener así una huella o perfil de la muestra para comparar en librerías (Reid, 2003). En segundo lugar, se pueden emplear técnicas de reconocimiento de patrones como métodos lineales: el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante lineal (LDA), el análisis de funciones discriminantes (DFA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), el análisis de clústers (CA) y el análisis de máquinas de vectores de soporte (SVM) (Loutfi et al., 2015; Wyszynski y Nakamoto, 2015). Otras técnicas de reconocimiento de patrones como son los métodos no lineales como el análisis de redes neuronales artificiales (ANN), la lógica difusa (*fuzzi logic*) o redes neurales probabilísticas (PNN) (Loutfi et al., 2015). Sea cual sea la técnica de procesamiento de los datos, al finalizar se obtendrá una clasificación, perfil o huella de la muestra y en algunos casos identificación del olor.

2.2 Aplicaciones

Las narices electrónicas aún no tienen una rigurosa implantación en las industrias de los alimentos y bebidas debido principalmente a problemas con la reproducibilidad, sensibilidad, envejecimiento, deriva y coste (Correa Hernando et al., 2005). Desde 1993, la cantidad de publicaciones del uso de sensores en la industria de los alimentos han sido de unas 5000 (Loutfi et al., 2015), por lo que sus posibles aplicaciones en este tipo de industrias son ilimitadas. Además de las detalladas en la Tabla 1, también se han aplicado para la detección de microorganismos a partir del espacio de cabeza en muestras de alimentos (Needham et al., 2005; Concina et al., 2010; Huang et al., 2015a), para determinar la presencia de levaduras

osmotolerantes en alimentos de alto contenido en azúcar (Wang et al., 2015) y para detectar la presencia de aflatoxinas en leche (Benedetti et al., 2005).

Tabla 1. Ejemplos de aplicaciones de narices electrónicas en alimentos y bebidas junto con el tipo y número de sensores, así como el procesamiento de los datos.

Aplicación	Tipo de sensor	Nº de sensores	Procesamiento de datos	Referencia
Identificación de leche adulterada	MOX	10	PCA, LDA	Yu et al., 2007
Detección de adulterantes en aceite de oliva	MOX	12	LDA, ANN	Oliveros et al., 2002
Clasificación del grado de deterioro de carne de ternera	MOX	7	LDA	Panigrahi et al., 2006
Evaluación de la vida media de piña	MOX	10	PCA, CA	Torri et al., 2010
Diferenciación geográfica de aceite de oliva	MOX	5	PCA, CA	Haddi et al., 2013
Evaluación de la calidad aromática de manzanas	QCM	8	PCA	Correa Hernando et al., 2002
Control del aroma del té a diferentes edades	MOX	10	PCA, LDA, PNN	Yu et al., 2009
Detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp. en refrescos	MOX	6	PCA, LDA, SVM	Concina et al., 2010
Detección de aflatoxinas en leche de oveja	MOX	10	PCA, LDA, PLS	Huang et al., 2015a
Detección de malos olores en vino y cerveza	MOX	12	PCA	Benedetti et al., 2005
Detección de malos olores en pescado	MOX	18	PCA, DFA	Ragazzo-Sánchez et al., 2009
Detección de malos olores en agua	Polímero conductor	32	PCA	Wilson et al., 2013
Detección de <i>Streptomyces</i> sp. productoras de geosmina en agua	Polímero conductor	14	PCA, DFA	Bastos y Magan, 2006

MOX: Sensores de óxido de metal; QCM: Sensor gravimétrico.

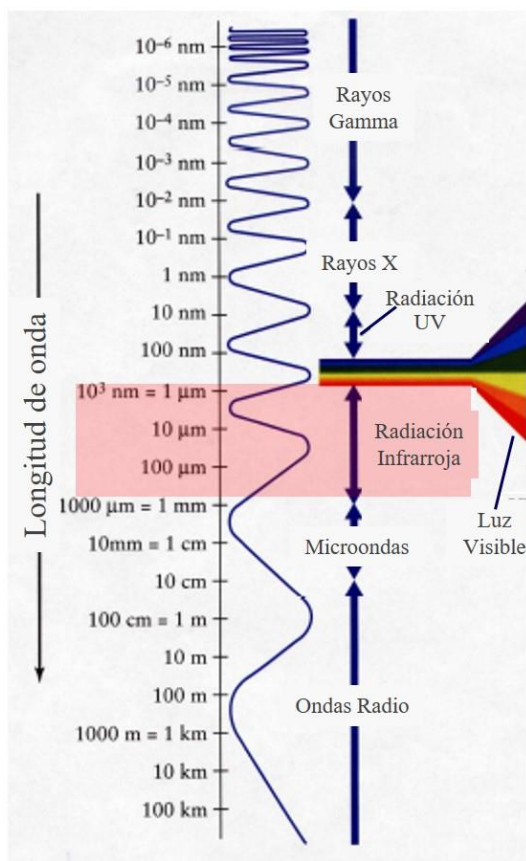
ANN: Análisis de redes neuronales artificiales; CA: Análisis de clúster; DFA: Análisis de funciones discriminantes; LDA: Análisis discriminante lineal; PCA: Análisis de componentes principales; PLS: Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales; PNN: Análisis de redes neuronales probabilísticas; SVM: Análisis de máquinas de vectores de soporte.

En relación a la detección de malos olores en bebidas y alimentos, hay estudios que proponen su uso como herramienta para detectarlos en cerveza o por ejemplo tricloroanisoles en corchos (Heberle et al., 2000; Reid, 2003) pero no se ha conseguido aplicar con éxito en la detección de 4 etilfenol o 4 etilguaiacol en vino o cerveza debido a la compleja matriz de volátiles de los mismos (Berna et al., 2008, Ragazzo-Sánchez et al., 2009) y a la interferencia del etanol con los sensores. En agua potable, las narices electrónicas han permitido detectar y diferenciar *Streptomyces* sp. productores de geosmina (Bastos y Magan, 2006). En pescado, aunque no se ha determinado qué compuestos eran los responsables, el uso de narices electrónicas posibilitan la detección de compuestos responsables de malos olores a niveles por debajo del valor umbral

de humanos (Wilson et al., 2013). En zumos, permiten detectar guaicol (olor fenólico) con una mayor sensibilidad que el panel de expertos (Huang et al., 2015b). De hecho, se destaca la gran utilidad de las narices electrónicas porque en ocasiones son capaces de detectar el mal olor a menor concentración que un panel de expertos.

3. Espectroscopía de infrarrojos

La radiación infrarroja se divide en tres regiones (Figura 3): infrarrojo cercano (NIR, *Near infrared*), el infrarrojo medio (MIR, *Mid infrared*) y el infrarrojo lejano (FIR, *Far Infrared*). La última es de gran utilidad en el análisis de compuestos inorgánicos pero raramente se utiliza en alimentos. Sin embargo, las dos primeras son las más usadas para análisis cualitativo y



Tipo IR	Longitud de onda
cercano	700-2500 nm
NIR	(0,7-2.5 μm)
medio	2500-25000 nm
MIR	(2,5- 25 μm)
Lejano	25000-10 ⁶ nm
FIR	(25-100 μm)

Figura 3. Espectro de la radiación electromagnética (imagen) y tipos de radiación infrarroja (tabla). Modificación de imagen de *NASA Langley Research Center Atmospheric Science Data Center* (<https://eosweb.larc.nasa.gov/>).

cuantitativo de gases (Ghosh y Jayas, 2009). Las moléculas de gas absorben radiación infrarroja de la misma frecuencia que las vibraciones de estiramiento y flexión de los enlaces entre sus átomos, originando una huella de absorción característica, pero no unívoca, que permitirá su identificación, bien por disminución de la intensidad de ciertas longitudes de onda que le llegan al detector o bien por el aumento de temperatura (Chou, 2000; Stuart, 2004). Así bien, si las posiciones de las bandas del espectro dan información sobre la estructura molecular de los compuestos, la intensidad lo hace sobre la concentración de esos compuestos según la Ley de Lamber-Beer. Sin embargo, en alimentos, debido a los numerosos componentes que contienen, se originan espectros complejos con bandas superpuestas difíciles de resolver. Para hacerlo, en primer lugar se suelen preprocesar los espectros con el fin de: 1) reducir el ruido de los mismos por medio de: la transformada de Fourier, aplicando la primera o la segunda derivada, corrección de la línea base, suavizado, etc., y 2), corregir efectos debido a la dispersión de la luz, para lo cual se emplean otras técnicas (Ghosh y Jayas, 2009). Posteriormente, a partir de los espectros preprocesados, se aplican métodos de análisis multivariante o quimiométricos para el estudio cualitativo, como los empleados en el análisis de datos de las narices electrónicas (PCA, LDA, DFA, PLS, ANN, etc.), y así extraer y clasificar los datos; mientras que para el estudio cuantitativo, se realiza con técnicas de regresión (Karoui et al., 2010).

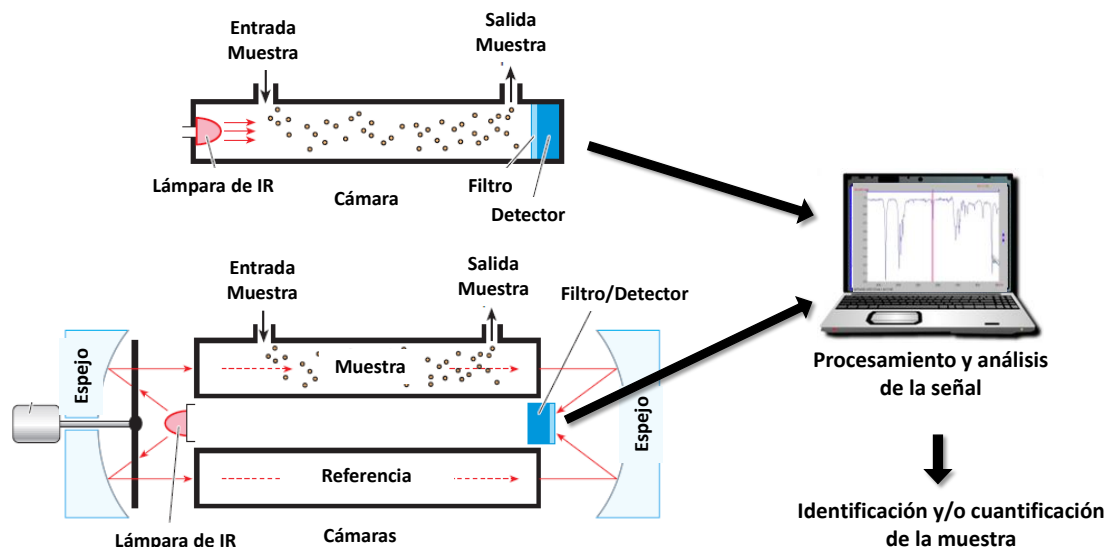


Figura 4. Representación esquemática de los componentes de un detector de gases infrarrojo, con una o dos cámaras. Modificación de Chow, (2000).

Normalmente, el sistema está formado por (Figura 4) una fuente de infrarrojos modulada o no, un camino o cámara con una longitud determinada donde interaccionan los gases con la luz IR, la presencia o no de filtros de paso de banda y al final un detector, el cual convierte la energía

de la radiación que le llega o cambios en la temperatura en señales eléctricas. Los sistemas pueden estar formados por una configuración de espejos para modular o direccionar la luz infrarroja y dos detectores o dos cámaras independientes (Chow, 2000).

La forma de presentación de la muestra más común en líquidos o sólidos homogéneos es la técnica llamada “reflectancia total atenuada” (ATR, *Attenuated Total Reflectance*) (Fahrenfort, 1961). Esta técnica ha permitido eliminar los problemas ocasionados por la fuerte absorción del agua y otros solventes que hacía perder información espectral (Gonzalez et al., 2011) y ha permitido además analizar el CO₂ disuelto en solventes (Kachko et al., 2016) y otros compuestos orgánicos volátiles del agua tras ser previamente adsorbidos a un polímero que recubre el cristal (Yang y Her, 1999; Lin y Li, 2010).

Actualmente existen dos tipos de instrumentos de infrarrojos. Los dispersivos o sistemas basados en monocromador, que utilizan prismas, rejillas, espejos, filtros sintonizables o lineales para dispersar las frecuencias de la radiación en la muestra y posteriormente medir la absorción individual de cada una de ellas. Por otro lado existen los de Transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier Transform*) o basados en un interferómetro que divide el haz de luz en las diferentes longitudes de onda, midiendo todas ellas simultáneamente tras su paso por la muestra y convirtiéndolas después en el espectro convencional a través de una transformación de Fourier (Ghosh y Jayas, 2009). Estos últimos son los más utilizados tanto con NIR como con MIR por su sensibilidad (Gonzalez et al., 2011) y selectividad, gracias a los filtros ópticos de banda diseñados para gases concretos que tienen la mayoría de estos sistemas (Chow, 2000).

3.1 Aplicaciones NIR y MIR

La principal ventaja del uso de la espectroscopía de infrarrojos es su versatilidad, ya que permite estudiar casi cualquier muestra independientemente del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies. De hecho, la muestra no entra necesariamente en contacto directo con la fuente de luz ni el detector, por lo que permite su uso hasta con gases corrosivos o reactivos. Además, es una tecnología rápida, fácil de utilizar, no necesita un tratamiento o preparación previa de la muestra, la muestra no se suele destruir y se puede utilizar como tratamiento no invasivo (Gómez-Carracedo et al., 2003). Además, se puede aplicar con cultivos celulares o in vivo sin que estos se vean dañados (Raichlin y Katzir, 2008)

A pesar de que el infrarrojo medio es el que se utiliza en la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales, la utilización del NIR ha experimentado un relativo auge desde la década de los 80, combinando su uso con otras técnicas como espectrofotometría Visible-Ultravioleta (Gómez et al., 2006; Shao et al., 2011) y sondas de fibra óptica para monitorear en tiempo real y remota, procesos de control de producción en alimentos y bebidas (Huang et al., 2008; Ghosh y Jayas, 2009). Según Wang y Paliwal (2007), las áreas de aplicación de la tecnología NIR tanto en materias primas como en productos procesados son: el monitoreo de la calidad del grano, manejo postcosecha de frutas y verduras, identificación de contaminantes en productos de origen animal y vegetal y la seguridad y autenticidad de los alimentos. Algunos ejemplos de la utilización de NIR para la detección de gases en alimentos son: la utilización de una fibra óptica remota para detectar volátiles de quesos madurados a diferentes tiempos, como acetaldehído, 2-butanol o 2-pentanona (González-Martín et al., 2014); determinación de volátiles fermentativos en vino tinto o de manzana (Lorenzo et al., 2009; Ye et al., 2016) o para la diferenciación de distintas marcas de un licor a partir de sus volátiles (Dong et al., 2016).

Los enlaces más importantes en espectroscopía NIR son los que contienen Hidrógeno, como en agua (-OH), péptidos (-NH), lípidos o carbohidratos (-CH, -OH) y los enlaces tipo C-O (Ghosh y Jayas, 2009). Sin embargo, en la espectropetría MIR, hay muchos más grupos funcionales con frecuencias de absorción en este rango, como carbohidratos, compuestos aromáticos, alcoholes, ésteres, aminas, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y amidas (Ghosh y Jayas, 2009). Ciertas ventajas de NIR en comparación con la espectroscopía MIR son la mayor penetración de la luz NIR en las muestras, transparencia a ciertos materiales de envasado y que la absorbancia del agua no suele ser tan fuerte como en MIR (Ellis et al., 2012). Sin embargo, las diferencias entre los espectros NIR de diferentes compuestos suelen ser muy sutiles ofreciendo poca información específica y más difícil de relacionar con la estructura química. Sin embargo, la espectrometría MIR es más sensible y permite una mayor diferenciación molecular, características logradas en parte gracias a su mayoritario uso combinado con la Transformada de Fourier (Gómez-Carracedo et al., 2003; Gonzalez et al., 2011).

La espectrometría de MIR tiene múltiples aplicaciones en la industria de los alimentos y bebidas. En el trabajo de Karoui et al., (2010) se recopilan y se señalan las principales, que están centradas en el análisis de la autenticidad, adulteración y determinación de ciertos parámetros físico-químicos. En derivados lácteos se aplica para controlar la coagulación de la leche, la autenticidad y atributos sensoriales del queso y para la predicción de parámetros físico-químicos. En carnes, para analizar su autenticidad y controlar parámetros microbiológicos y físico-químicos de

deterioro (Ellis et al., 2002). En pescados, para predecir la presencia de dimetilaminas o diferenciar entre pescado fresco y congelado. En aceites, para la discriminación de los diferentes tipos y detección de aceites adulteradas. En productos azucarados, para predecir el contenido de azúcar, la autenticación o adulteramiento de dichos productos. En frutas y vegetales, para clasificación y determinación de parámetros físico-químicos. En café para discriminar variedades y detectar adulteraciones (Zhang et al., 2016). En la Tabla 2 aparece una representación de algunas de estas aplicaciones, así como el pretratamiento y tipo de procesamiento de los espectros empleados.

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de espectrometría MIR en alimentos y bebidas junto con el pretratamiento de los espectros así como el procesamiento de los mismos.

Aplicación	Técnica	Pretratamiento	Procesamiento espectros	Referencia
Determinación de parámetros químicos en queso	MIR	1ª derivada Suavizado	PLS	Karoui et al., 2006
Monitorización del deterioro de carne de ternera	ATR, FT-MIR	-	PCA, DFA, PLS	Ammor et al., 2009
Determinación de aceites de oliva adulteradas con aceite de girasol	ATR, FT-MIR	-	PCA, PLS	Tay et al., 2002
Detección de la adulteración de miel con soluciones de azúcar	ATR, FT-MIR	1ª y 2ª derivada	PLS	Kelly et al., 2004
Clasificación de frutos de caqui según el origen	FT-MIR	Corrección ortogonal de la señal	PCA, CA	Khanmohammadi et al., 2014
Diferenciación entre <i>Bacillus</i> y <i>Alicyclobacillus</i> en zumo	FT-MIR	Suavizado 2ª derivada	PCA	Al-Holy et al., 2015
Clasificación de vinos por la presencia o no de guaiacol o 4-metilguaiacol	MIR	-	PCA, LDA	Fudge et al., 2011

ATR: Reflectancia total atenuada; MIR: Espectroscopía de infrarrojo medio; FT-MIR: Espectroscopía de infrarrojo medio con Transformada de Fourier

CA: Análisis de clúster; DFA: Análisis de funciones discriminantes; LDA: Análisis discriminante lineal; PCA: Análisis de componentes principales; PLS: Análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales

El uso de la espectrometría NIR en comparación con MIR para la detección de gases en alimentos está más extendido. Por el contrario, la tecnología MIR se utiliza más frecuentemente en funciones clínicas, como detección de marcadores respiratorios de enfermedades (Kim et al., 2010) y a nivel de gases ambientales. Para detectar componentes volátiles orgánicos del agua, se usan membranas con material hidrofóbico o se suele cubrir con un polímero hidrofóbico el

crystal de ATR. De esta forma se detectan tetracloroetano o estireno a niveles de ppm o ng/ml (Yang y Ramesh, 2005; Lin y Li, 2010).

3.2 MWIR

Dentro de la tecnología basada en el infrarrojo, existe mucha disparidad en donde establecer los límites entre los tres tipos de radiación citados en el apartado anterior, de forma que la radiación infrarroja media según algunos autores abarca desde los 2,5 hasta los 25 μm y según otros desde 1 hasta 15 μm (1000-1500 nm). Aún sin tener estos límites esclarecidos, la radiación infrarroja media se divide a su vez en tres tipos (Tabla 3). Existen detectores con sensibilidades mayores a estos rangos pero debido a la absorción atmosférica (los gases, agua, polvo, etc., que pueden reducir la radiación que llega al detector), se optimizan para cada uno de estos rangos que son donde la atmósfera es transparente a la radiación infrarroja. SWIR y MWIR son los denominados infrarrojos térmicos porque son los emitidos por cualquier objeto caliente (Gowen et al., 2010). Aunque también existen dispositivos basados en detectores térmicos, los detectores empleados en estas longitudes de onda suelen ser detectores fotoconductores, los

Tabla 3. División de la radiación infrarroja media.

Tipo de MIR	Longitud de onda	Cuerpos que lo emiten
SWIR (<i>Short-Wave InfraRed</i>) o de banda corta	1000-3000 nm 1 – 3 μm	Radiación de fuentes muy calientes y reflexiones solares
MWIR (<i>Mid-Wave InfraRed</i>) o de banda media	3000-5000 nm 3 – 5 μm	Radiación de cuerpos calientes y combustión de gases
LWIR (<i>Long-Wave InfraRed</i>) o de banda larga	8000-12000 nm 8 – 12 μm	Radiación de cuerpos próximos a temperatura ambiente

cuales están contruidos con un material semiconductor que aumenta su conductividad debido a la interacción con fotones incidentes. Los de seleniuro de plomo (PbSe) o los de telurio-cadmio-mercurio (HgCdTe) son los materiales semiconductores que más se emplean en la banda MWIR. Estos detectores constan de elementos individuales o pixeles (desde 100 hasta 1000) y localizados en una matriz de plano focal (FPA, *Focal Plane Array*) de forma lineal o en dos dimensiones (Rogalski, 2012) (Figura 5). Las cámaras térmicas más recientes son del tipo FPA con hasta 10⁶ elementos.

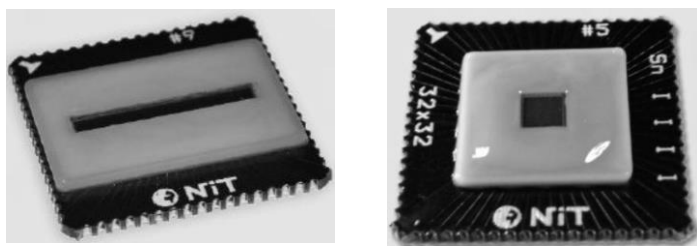


Figura 5. Diferentes formatos de detectores MWIR, lineal (izquierda) y en dos dimensiones (derecha). (Vergara et al., 2011).

Dentro de este tipo de detectores, una parte que encarece mucho su uso, es la necesidad de tener incorporado dentro de la cámara donde está situado, un sistema de refrigeración y un sellamiento al vacío que

proteja al semiconductor de la atmósfera durante al menos diez años. La necesidad de abaratar los costes para introducir estos dispositivos en el mercados a gran escala, en aquellas aplicaciones donde se necesiten grandes cantidades, ha hecho que muchas investigaciones de las décadas anteriores se hayan centrado en la creación de detectores no refrigerados, económicos y con buenas prestaciones pero que permitan trabajar a temperatura ambiente (Vergara et al., 2007). La tendencia a usar cada vez más detectores fotoconductores sin refrigeración, ha permitido a su vez integrar una electrónica asociada que opera a mayor velocidad de respuesta (o mayor imágenes por segundo que genera) (Vergara et al., 2011).

La espectroscopía MWIR presenta un gran potencial prometedor en el mercado actual de dispositivos de rayos infrarrojos, debido al buen rendimiento que presentan, marcado por su buena sensibilidad, velocidad de respuesta, permite ensayos no destructivos y no invasivos, etc. (Linares-Herrero et al., 2012). De esta forma, esta tecnología ha logrado abarcar muchos campos de aplicación dentro de la seguridad y defensa, como la visión nocturna, detector de movimientos (Rogalski, 2011); aplicaciones ambientales como la detección y control de gases, medida de contaminación o detección de fuegos (Zhang et al., 2011); aplicaciones industriales como la inspección y el control industrial de empresas de vidrio, acero, etc.; el control de procesos de fabricación (soldadura por láser, corte...); o caracterización de propulsores de combustión (Vergara et al., 2011). Para estas aplicaciones se suelen usar cámaras térmicas que detecten la emisión térmica de los objetos. En otros casos, detectores pequeños que detectan la disminución de la intensidad de ciertas longitudes de onda debido a la absorción de los enlaces de las moléculas. El menor tamaño de estos dispositivos en comparación con los aparatos clásicos de infrarrojos estáticos, abre el abanico de aplicaciones de estos dispositivos fuera del laboratorio para otras aplicaciones industriales o ambientales, de agricultura o medicina.

Los espectrómetros MIR en general son instrumentos de laboratorio diseñados para operar en ambientes estáticos, sin movilidad. La principal barrera para ampliar el uso de los dispositivos

MWIR fuera del laboratorio es la falta de elementos como las fuentes de luz de infrarrojos o, como ya se ha comentado, detectores no refrigerados de bajo coste (Linares-Herrero et al., 2012). Existen diferentes empresas que cuyas investigaciones en el uso de nuevos materiales y tecnología en los últimos años ha permitido fabricar y comercializar dispositivos MWIR de bajo coste (Linares-Herrero et al., 2012).

La termografía, basada en la detección de la radiación infrarroja media SWIR, MWIR o LWIR emitida por cuerpos, es una herramienta emergente para evaluar la calidad y el control de la seguridad de los alimentos. La mayoría de las propuestas están en fase de experimentación sin todavía una adopción industrial (Gowen et al., 2010). Se aplican en: el seguimiento y la validación de la temperatura de los alimentos o de ciertos procesos de los mismos, ya que no requieren contacto, previniendo así su contaminación (Foster et al., 2006; Gowen et al., 2010); para evaluar la calidad postcosecha de frutas, verduras y granos de cereal (Manickavasagan et al., 2010; Opara et al., 2014) o para detectar cuerpos extraños en los alimentos (Ginesu et al., 2004; Senni et al., 2014).

La aplicación actual más importante de los dispositivos MWIR es para la detección de gases a nivel industrial. Suelen ser cámaras con detectores de gas de ruta abierta, para la grabación de imágenes de fugas de una amplia variedad de compuestos orgánicos volátiles, gases inflamables y tóxicos, los cuales no son detectados a simple vista (Linares et al., 2015). De hecho, se ha propuesto la utilización de un detector FPA refrigerado de amplia banda (MWIR y LWIR) para la grabación de imágenes y posterior procesamiento, a la hora de detectar gases tóxicos o peligrosos para el medio ambiente (Jin et al., 2014). Williams et al., en 2006 diseñó un híbrido entre una cámara/espectrómetro refrigerado de MWIR (3 – 5 μm) con un filtro de 3,4 μm para la visualización de gases que absorban en ese rango estrecho, como hidrocarburos alcanos, posicionado junto con un espectrómetro FT-IR para su identificación. Del mismo modo, Cetin y Akers en 2011 patentaron la utilización de una combinación de imágenes y video visibles e infrarrojas dentro del rango SWIR y MWIR, junto con el procesamiento dinámico de los mismos, para detectar fugas de compuestos orgánicos volátiles en la industria petroquímica. La tecnología MWIR también permite la detección de compuestos orgánicos e inorgánicos en el aire como CO₂, CO, metano o etileno (Naranjo y Baliga, 2012; Gagnon et al., 2014).

Nuestro grupo (YEAST) tiene gran experiencia con ciertas industrias de alimentación aquejadas de la presencia 1,3-pentadieno en los productos con sorbatos en su formulación, como turrone, mazapanes, aguas saborizadas, etc. En la Tabla 1 del capítulo 2 se muestran todos los alimentos en los que se ha descrito en la bibliografía la aparición de este compuesto. De mayor impacto es

el estudio de Gürbüz en 2011, el cual identificó la presencia de este compuesto en cantidades de 5 hasta 5000 mg/l, en 21 productos de supermercado que contenían sorbatos en su composición.

Aunque la detección sensorial del 1,3-pentadieno es factible (Casas et al., 1996) y fiable como hemos visto en el capítulo 2, en la mayoría de los estudios publicados se emplea la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para una correcta identificación y cuantificación del compuesto en alimentos. Esta técnica implica mucho tiempo, personal cualificado y es muy cara de aplicar en la industria. Dentro del Campus de Excelencia Internacional de Moncloa, el grupo LPF_TAGRALIA, tiene gran experiencia en el diseño y adaptación de dispositivos para la detección de gases en la determinación de la calidad en industrias Agro-Alimentarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Espectrómetro MWIR

El equipo de espectrometría está formado por (Figura 6):



Figura 6. Dispositivo diseñado para la medida de gases con detectores de MWIR. A la izquierda aparece la lámpara de infrarrojos, en el medio la cápsula diseñada para confinar el gas y a la derecha la cámara detectora de MWIR.

1. Una fuente de radiación infrarroja en el rango del infrarrojo medio (MWIR). Se trata de una lámpara con filamento de SiC (Hawkeye Technologies, Connecticut, Estados Unidos) acoplado a un reflector de aluminio parabólico que permite abrir y colimar la radiación.
2. Detector MWIR desarrollado por la empresa NIT Europe (New Infrared Technologies, Madrid, España), el LX-CORE-S-LVF. Se trata de un detector compacto compuesto por: un módulo electrónico LUXELL 128 FPA con LVF, formado por una matriz de plano focal (FPA) lineal de 128 detectores o píxeles y acoplado a un filtro lineal variable (LVF, *Linear Variable Filter*), sensible en el rango espectral del infrarrojo medio entre 3 y 4,6 μm ; una tarjeta de lectura electrónica; una interfaz de comunicación USB con un ordenador y un paquete software para la adquisición y visualización de los datos.

Estos detectores se fabrican con deposición del material PbSe policristalino mediante evaporación térmica (VPD, *Vapor Phase Deposit*) y además trabajan a temperatura ambiente y no necesita ningún sistema de refrigeración, lo cual abarata enormemente los dispositivos, les confiere mayor estabilidad y facilita altas velocidades de adquisición. Adicionalmente, este dispositivo permite una grabación de datos en dinámico a velocidades variables (en nuestro caso a 360 imágenes por segundo), lo que permite obtener datos en tiempo real.

3. Un dispositivo portador de las muestras (ver Figura 7), en el medio de las dos partes anteriores, formado por una cápsula que confina el gas entre un par de obleas de zafiro

que son transparentes al haz de radiación infrarroja, con un volumen de 32,26 cm³. La cápsula dispone de dos aberturas para acoplar las muestras, una para tubos eppendorf y otra para tubos con un tapón de rosca con llave, diseñado para abrir o cerrar la entrada de los gases de las muestras en el dispositivo.

Se seleccionó una distancia fija entre la fuente de luz IR y el detector de forma que se asegurara una iluminación homogénea en el detector.

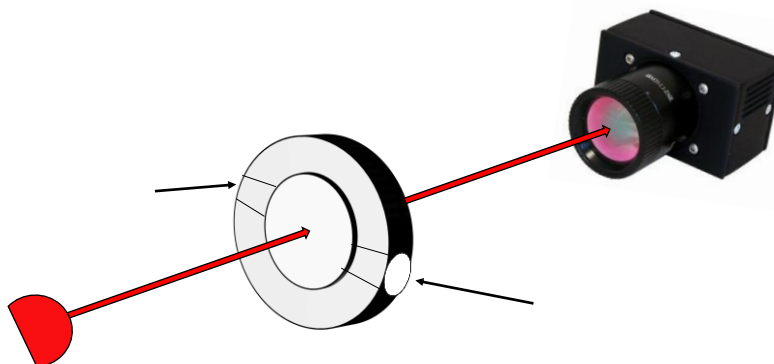


Figura 7. Cápsula diseñada para confinar el gas en su interior mientras el haz de luz infrarroja pasa a través de ella y se recogen las absorciones de los gases por el detector. La cápsula dispone de dos aberturas (flechas), una para tubos eppendorf y otra para tubos con tapón de rosca.

2. Ensayos con compuestos patrón puros

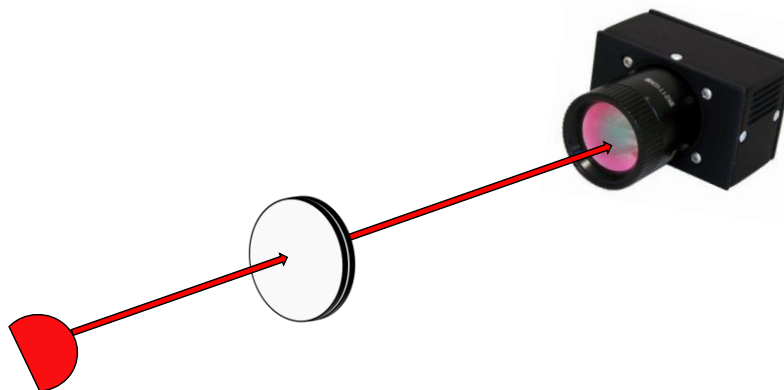
Para las mediciones de los compuestos patrón puros se realizaron mediciones estáticas, ya que al presentar una concentración relativamente alta de los compuestos en el espacio de cabeza o en el líquido, las bandas de absorción pueden identificarse fácilmente en el espectro aislado.

2.1 Ensayo de compuestos en fase líquida

Se realizaron mediciones en el espectrómetro MWIR de diferentes diluciones tanto de sorbato potásico (Scharlau, Barcelona, España) como de 1,3-pentadieno (mezca de isómeros al 50 % Cis-Trans (Aldrich-Chemical, Wiscosin, Estados Unidos)) en fase líquida, a diferentes concentraciones aproximadas (Tabla 4) obtenidas a partir de diluciones en agua destilada de los compuestos puros hasta un volumen final de 1 ml. Las diluciones de 1,3-pentadieno se realizaron en hielo para evitar su evaporación.

Tabla 4. Concentraciones aproximadas de los compuestos usados en el ensayo en fase líquida.

Compuesto	Concentraciones aproximadas
1,3-pentadieno	0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 700 mg/l
Sorbato potásico	0; 0,01; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 g/l

**Figura 8.** Sistema de un par de obleas de zafiro en paralelo entre la lámpara de IR y el detector, entre las cuales se depositan las muestras líquidas.

La medición en fase líquida se llevó a cabo de la siguiente forma. En primer lugar, se colocaron las dos obleas de zafiro juntas (Figura 8) en un sistema metálico en paralelo entre la lámpara y el detector para calibrar el detector. A continuación, empezando por las diluciones menos concentradas hasta las más concentradas, se tomó una cantidad de cada una de ellas suficiente para cubrir la superficie interna entre las dos obleas, De esta forma se midieron al menos dos réplicas de cada concentración y tres repeticiones por réplica.

2.2 Ensayo de compuestos en fase gaseosa

La presencia de 1,3-pentadieno en forma gaseosa se analizó empleando la cápsula confinadora de gas (Figura 7) con la abertura para tubos de rosca sellada. Se utilizaron réplicas de las concentraciones empleadas para el ensayo en fase líquida, en tubos eppendorf de 1,5 ml que se conectaron a la cápsula. Una vez conectada cada muestra, se dejó que se volatilizara durante 1 minuto y se grabaron las medidas una vez alcanzada la estabilización (medida estática). El orden de las mediciones fue también de menor a mayor concentración de 1,3-pentadieno y se grabaron dos réplicas por concentración y tres repeticiones de cada réplica.

3. Ensayos con cultivos celulares de levaduras

Se han utilizado diferentes cepas, tanto productoras como no productoras de 1,3-pentadieno de diferentes especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 y *Debaryomyces fabryi* PR66 como productoras y *S. cerevisiae* EPD 1.1.2 y *Debaryomyces hansenii* CBS 766 como cepas no productoras. Los tubos de medición empleados tienen un volumen final de 25 ml a los que se le acopla un tapón hermético con llave de apertura y cierre para la salida de los gases, tapón que se ensambla a rosca a la cápsula de medición (Figura 9).



Figura 9. Tubo de medición con tapón hermético que incluye una llave de apertura y cierre para la salida de los gases generados en el espacio de cabeza de los cultivos de levaduras hacia la cápsula de medida.

Para los cultivos en los tubos de medición se utilizó medio YMB suplementado con 0,75 g/l de sorbato potásico a un pH final de 7. Los tubos, con dos volúmenes finales de medio de 9 o 18 ml, se inocularon con 1 o 2 ml de una suspensión 6 McFarland (10^8 células/ml) respectivamente, previamente recogida de un cultivo de 24 o 48 h en YMA. Se realizaron al menos dos réplicas de cada cepa. Tanto las muestras con levaduras como las muestras sin levaduras se incubaron a 28°C durante 4 días en agitación antes de la medición.

Como la concentración de 1,3-pentadieno producido por algunas levaduras en el espacio de cabeza es muy baja, la absorbancia de los gases

puede que no esté bien resuelta. Por ello se decidió que, para la medición de los gases generados se llevara a cabo una medición en dinámico de la difusión de estos compuestos al interior de la cápsula. El procedimiento para cada muestra, duraba 370 segundos de grabación, se realizó de la siguiente forma: se conecta el tubo de la muestra a la cápsula y durante el primer minuto comienza la grabación hasta la estabilización del sistema; al minuto se abre la llave para que difundan los gases al interior de la cápsula (Carga, empieza a los 60 segundos); a los 5 minutos se cierra la llave y se desconecta el tubo de la cápsula (Desconexión, 360 segundos); por último, se deja la cápsula abierta para el vaciado de los gases por difusión (Vaciado, hasta los 370 segundos).

4. Análisis de espectros

En la Figura 10 se puede observar un esquema resumen de los procedimientos empleados para el análisis de los espectros de las muestras. Todos ellos se han realizado utilizando rutinas de análisis programadas en MATLAB® Versión R2015 (The MathWorks, Inc., Massachusetts, Estados Unidos), por lo que los espectros (archivos.dat), utilizando la función NIT_READ creada al efecto, se convierten en matrices numéricas de datos (archivos.mat) con dimensión de n imágenes por 128 canales de información o longitudes de onda.

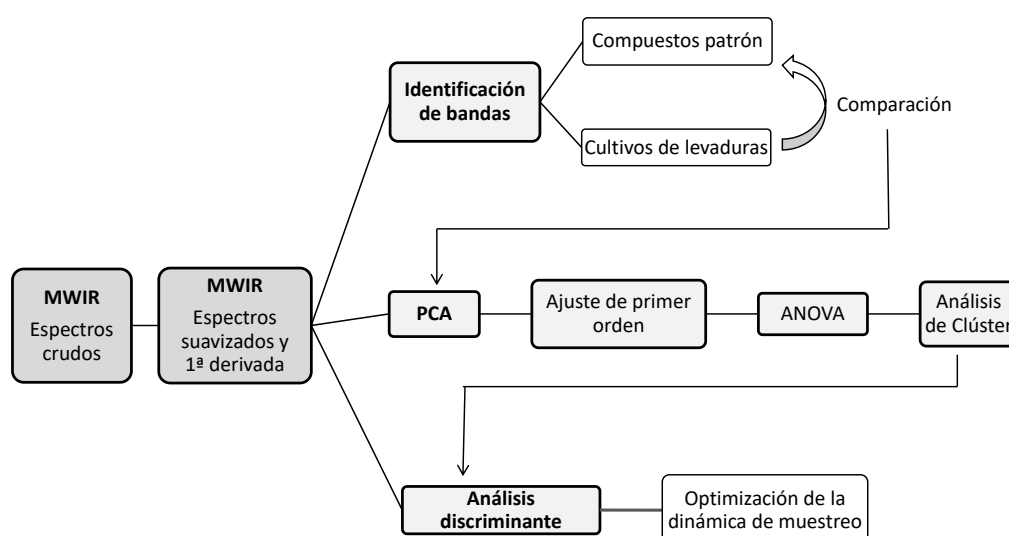


Figura 10. Esquema sumario de los procedimientos seguidos para el análisis de los espectros generados.

En primer lugar, a partir de los espectros crudos, se extrajeron los intervalos de interés, desde aproximadamente los 60 hasta los 370 segundos, obteniendo entre 1 y $1,1 \cdot 10^5$ espectros por muestra. Después, se realizó un preprocesamiento de los mismos para disminuir su ruido usando el algoritmo de Savitsky-Golay, el cual cada w puntos tanto a la derecha como a la izquierda de un punto (ancho de ventana) de las curvas de los espectros, los ajusta a una polinomial de orden x . Para ello se emplearon los siguientes parámetros: ancho de ventana o $n=11$, orden de la polinomial 2, y orden de la derivada 0 (señal original suavizada). Así se consiguió suavizar los

espectros. Posteriormente, con la misma función pero con el parámetro de orden de derivada igual a 1, se realizó la primera derivada de los espectros suavizados.

Partiendo de la primera derivada de los espectros se realizaron tres procedimientos: a) la **identificación de las longitudes de onda de absorción y su ancho asociado** y la comparación entre las bandas de los compuestos patrón y de los cultivos de levadura, b) **análisis no supervisado** de los componentes principales de los espectros (PCA), seguido de un ajuste no lineal de las respuestas de primer orden de la difusión de los gases en el montaje experimental, análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 5 % y análisis de clúster de las respuestas, c) **análisis supervisado** mediante un análisis discriminante y una optimización de la dinámica de muestreo.

4.1 Identificación del ancho de la banda de absorción

En espectrometría MWIR las bandas de absorción se caracterizan por la presencia de un intenso decremento en la transmitancia ($f(-1)$ en Figura 11), y tradicionalmente el ancho de banda se corresponde con la mitad de la amplitud (A) de la onda (líneas y puntos rojos de la Figura 11). En este estudio, para averiguar el ancho de las bandas de absorción, hemos utilizado un método más visual, empleando la representación de la primera derivada de la señal. Los puntos donde la primera derivada son igual a cero, $f'(x)=0$, se corresponden con los puntos de tangente horizontal de la señal original ($f(x)$ o $f(-1)$) (líneas y puntos grises de la Figura 11), y los puntos de tangente horizontal de la derivada se corresponden con los puntos de inflexión de la señal original, muy cercanos al concepto de ancho de banda. Del mismo modo, el centro de las longitudes de onda de absorción será el segundo punto donde la primera derivada se hace 0.

El ancho de banda de los compuestos patrón en líquido (sorbato potásico y 1,3-pentadieno) y fase gas (1,3-pentadieno), así como el espacio de cabeza tres cultivos de la levadura *D. fabryi* PR66 se calcularon usando una secuencia de comandos de MATLAB diseñada para calcular el ancho de banda de la primera derivada de las curvas espectrales, con los puntos de tangente horizontal resaltándose posteriormente en la señal original. A partir de los resultados se calcularon las desviaciones típicas.

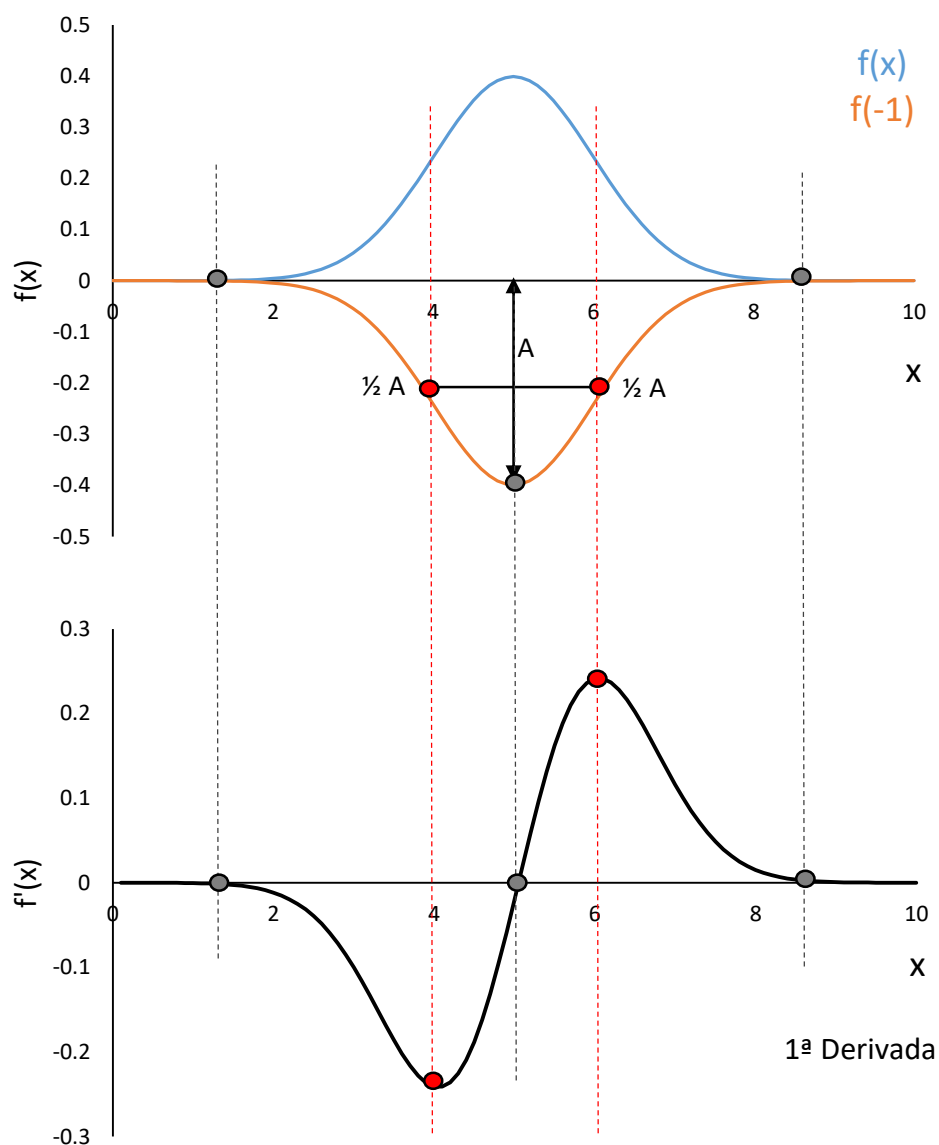


Figura 11. Método empleado para calcular el ancho de las bandas de absorción. Los puntos donde la primera derivada de la señal son igual a cero, $f'(x)=0$, se corresponden con los puntos de tangente horizontal de la señal original ($f(x)$ o $f(-1)$) (líneas y puntos grises), y los puntos de tangente horizontal de la derivada se corresponden con los puntos de inflexión de la señal original, muy cercanos al concepto de ancho de banda (mitad de la amplitud de la onda, líneas y puntos rojos). El centro de las longitudes de onda de absorción será el segundo punto donde la primera derivada se hace 0.

4.2 Análisis no supervisado

A partir de la primera derivada de los espectros extraídos de interés de cada muestra dinámica, estos se concatenaron muestra tras muestra siguiendo el orden de experimentación (10^5 espectros por muestra).

Lo primero que se realiza a partir de ellos es un **análisis de componentes principales (PCA)** con la función PCA de MATLAB. Esta técnica es un procedimiento multivariante que permite la reducción de la dimensionalidad sin pérdida de información. En este caso disponemos de 128 canales de partida correspondientes a las distintas longitudes de onda y procedemos a diagonalizar la matriz de covarianzas de la primera derivada de los espectros suavizados, quedándonos con los componentes principales que reflejan más del 99 % de la varianza original.

La primera derivada de los espectros originales suavizados [X] proyectados en el espacio de componentes principales se denominan *scores* [S] y los coeficientes necesarios para proyectar los espectros en dicho espacio se denominan *loadings* [L]. Las dimensiones de las distintas matrices se describen en la ecuación siguiente:

$$[S]_{n \times PC} = [X]_{n \times m} \cdot [L]_{m \times PC}$$

Donde n es el número de espectros, PC, el componente principal y m, el número de longitudes de onda.

En segundo lugar, a partir de los resultados de la representación de los *scores* de los componentes principales de cada muestra dinámica, se realizó un **ajuste de la respuesta de primer orden (no lineal)** de la difusión de los gases en el dispositivo experimental, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Valor de PC} = a \cdot (1 - e^{(-t/b)})$$

Donde *a* es la señal de estabilización o el nivel máximo de intensidad (recuentos de intensidad), *t* es el tiempo de muestreo (ms) y *b* el tiempo de respuesta o intervalo de tiempo entre la señal inicial y el 63 % de la señal final de los espectros de cada muestra (ms). Este ajuste, que se realizó 3 veces con cada muestra, se llevó a cabo empleando una rutina programada al efecto con MATLAB, que permite seleccionar el inicio y el final de la señal y filtra los datos haciendo la media de cada 100 espectros para eliminar ruido. Dicha rutina emplea un método de ajuste no lineal, basado en una función algebraica definida por el usuario, en este caso el valor del PC. Esta rutina permite obtener los parámetros *a*, *b*, así como el coeficiente R², de cada muestra y para cada componente principal.

En tercer lugar, con los valores del parámetro obtenido *a* del ajuste de la respuesta de primer orden para cada componente principal, se realizó un análisis de la varianza (**ANOVA**) de un factor con un nivel de significación del 5% y utilizando el estadístico F de Fisher de la función de Excel (Paquete Microsoft Office, 2013).

Por último, a partir de los datos de estabilización de señal, a , del PC2, PC3 y PC4, se realizó un **análisis de clúster** o agrupación de cada una de las repeticiones y réplicas de las muestras de 18 ml usando el método de Ward. El método de Ward es un procedimiento de agrupación secuencial en el que en cada paso una muestra se agrega a un clúster recalculándose de nuevo el centro de gravedad de la agrupación teniendo en cuenta la distancia de la muestra a cada uno de los centroides de los clústers. En este caso se empleó la distancia Euclídea, que no tiene en cuenta la covarianza entre las variables, desde cualquier punto al centroide, puesto que los valores de a de los PCs no están linealmente correlacionados. Para ello se utilizó un algoritmo de clasificación en MATLAB que contiene las siguientes funciones: `pdist`, distancia; `linkage`, realiza la agrupación siguiendo el método de Ward; `dendrogram`, que representa el árbol de asociación; y `clúster`, índice al que pertenece cada muestra para un número máximo de grupos.

4.3 Análisis supervisado

A partir de la primera derivada de los espectros suavizados correspondiente a la señal dinámica de cada muestra de 18 ml, se seleccionan los 2000 últimos espectros (5,5 segundos previos a los 370 segundos finales de la señal). Con estos 2000 espectros se realiza una media y se lleva a cabo un **análisis discriminante**, asignando a priori a los espectros de cada muestra la clase a la que pertenecen: medio, productores de 1,3-pentadieno o no productores de 1,3-pentadieno. Se fija el número de funciones discriminantes y de variables canónicas que discriminen entre las clases definidas, valor de 2 (n clases - 1). Con este análisis se intenta ver qué variables canónicas (combinación lineal de longitudes de onda) clasifican las diferencias entre espectros, de forma que se maximicen las diferencias entre las clases o grupos que quieres predecir y minimice las diferencias dentro de cada grupo.

El análisis discriminante se realizó utilizando la función `PLS_DA`, es decir *Partial Least Square Discriminat Analysis*. Esta función combina dos procedimientos primitivos el PLS y el DA. El PLS es un método cuantitativo similar al PCA, pero con carácter supervisado que maximiza la covarianza entre los espectros originales y una variable a estimar, la clase o grupo. El DA aplicado sobre el PLS maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro de los grupos.

Como validación interna, una vez realizado este análisis, se proyectan los 2000 espectros de cada muestra en las variables canónicas obtenidas y se obtiene el porcentaje de error de clasificación de los espectros.

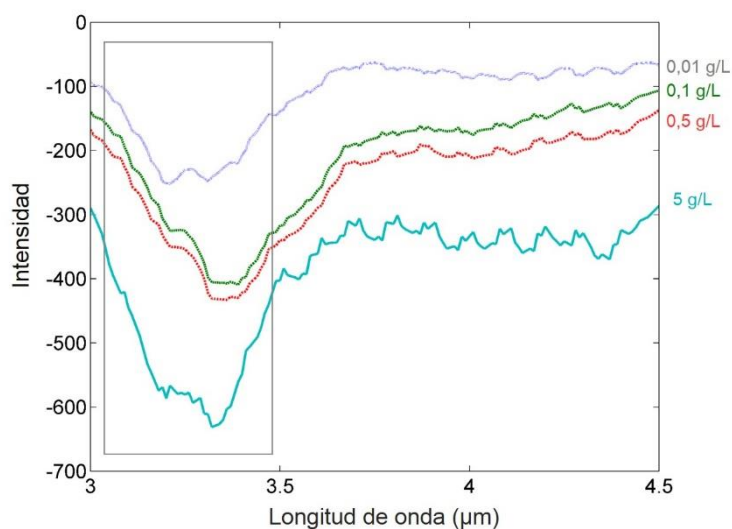
Para una **optimización del análisis y asegurar la segregación dinámica**, se proyectaron los espectros de la primera derivada de diferentes tiempos de grabación, desde los 280 segundos hasta el final. Se tomaron en torno a 2000 espectros alrededor de cada tiempo y se proyectan en las variables canónicas definidas. El área del triángulo que forman los centroides de las clases en el plano canónico de cada tiempo, se utilizó para determinar el poder de discriminación en cada instante, de forma que, cuanto mayor fuera el área del triángulo, mayor poder de segregación entre grupos o clases. El área entre los centroides fue determinado por la función polyarea de Matlab.

RESULTADOS

1. Comparación del ancho de las bandas de absorción

Los espectros de absorción de los compuestos patrón en fase líquida se muestran en la Figura 12. En la parte a) se muestra el espectro de cuatro concentraciones crecientes de sorbato

a) Sorbato potásico



b) 1,3-pentadieno

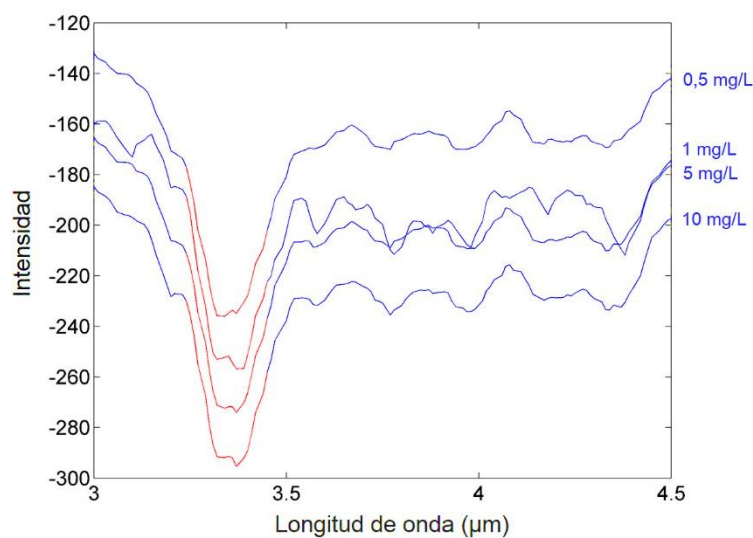


Figura 12. Espectro MWIR de concentraciones de a) sorbato potásico y b) 1,3-pentadieno en fase líquida. El rectángulo en la figura a) y las regiones rojas en la figura b) indican las zonas de absorción, caracterizado por un decremento en su transmitancia.

potásico, de forma que se observaba un decremento de la señal MWIR recibida por el receptor (disminución de la transmitancia debido a la absorción de luz de los compuestos), entre unas longitudes de onda máximas entre 3 y 3,5 μm (rectángulo). La menor concentración analizada, 0,01 g/l, también es fácilmente detectable por este tipo de tecnología. En la Figura 12 b) se muestra el espectro de cuatro concentraciones crecientes de 1,3-pentadieno en fase líquida.

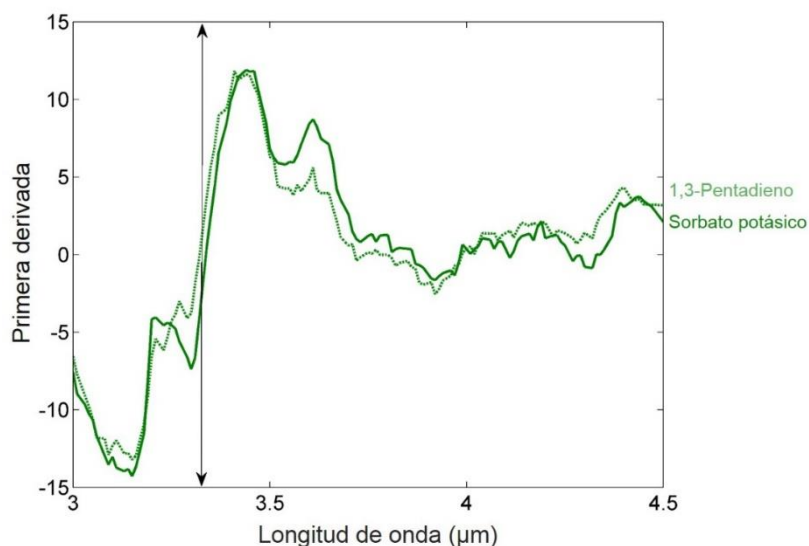


Figura 13. Primera derivada del espectro correspondiente a 1,3-pentadieno y sorbato potásico. La flecha muestra el centro de absorción común al 1,3-pentadieno y al sorbato potásico (aproximadamente 3,30 μm).

En la Figura 13 aparece una representación de la primera derivada del espectro de sorbato potásico y de 1,3-pentadieno. En ella se puede comprobar que tanto el 1,3-pentadieno como el sorbato potásico en fase líquida presentaban prácticamente el mismo rango de absorción (mínimo y máximo de la derivada), entre 3,11 y 3,45 μm , observándose que el centro del mismo se sitúa en torno a casi 3,30 μm (flecha). En la Tabla 5 aparecen detallados los rangos de absorción concretos de los compuestos patrón líquidos.

Al analizar el 1,3-pentadieno puro en fase gaseosa, observamos que el rango de absorción que se obtuvo fue un poco más estrecho que para fase líquida, entre 3,25 y 3,46 μm (Tabla 5). Pero al observar el espectro de absorción MWIR del espacio de cabeza de las diferentes réplicas de *D. fabryi* PR66 (Figura 14) al poco tiempo de la apertura de la conexión del cultivo hacia la cápsula, se observó que, a diferencia de los compuestos puros donde únicamente había un pico

Tabla 5. Rango de absorción junto con sus desviaciones típicas que presentaban las muestras de patrones en líquido y gas, así como del espacio de cabeza de varias réplicas de los cultivos de la levadura *D. fabryi* PR66.

		Rango de absorción adscrito a 1,3-pentadieno (μm)		Rango de absorción adscrito a CO ₂ (μm)	
		Inicio	Final	Inicio	Final
Líquido	1,3-pentadieno	3,11 \pm 0,00	3,44 \pm 0,03	-	-
	Sorbato potásico	3,14 \pm 0,03	3,45 \pm 0,02	-	-
Gas	1,3-pentadieno	3,25 \pm 0,04	3,46 \pm 0,00	-	-
	<i>D. fabryi</i> PR66	3,16 \pm 0,02	3,29 \pm 0,04	4,10 \pm 0,04	4,32 \pm 0,01

pronunciado de absorción, en ellos se observaban dos picos. El primero de ellos, con un ancho de banda entre 3,15 y 3,30 μm se corresponde al 1,3-pentadieno, el cual tiene un rango más estrecho que los compuestos puros. El segundo de los picos detectados, entre 4,10 y 4,30 μm aproximadamente, a priori se corresponde con el CO₂ que puede producir esta cepa de levadura. La intensidad de absorción para el 1,3-pentadieno en el caso de cultivos de levadura fue mucho menor que los obtenidos con 1,3-pentadieno puro líquido. A raíz de esta diferencia de señal se decidió realizar un análisis dinámico de los espectros. En la Figura 15 se puede ver un ejemplo

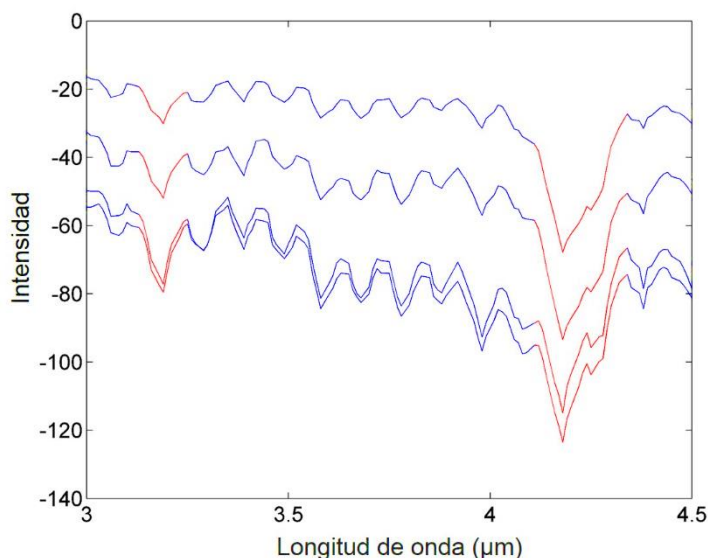


Figura 14. Espectro MWIR del espacio de cabeza de varios cultivos de la cepa *D. fabryi* PR66 en YMB con sorbato potásico tomado a los 30 segundos de la conexión y apertura del cultivo a la cápsula. En rojo aparecen las dos zonas de absorción detectadas, 3,15-3,30 y 4,10-4,30 μm correspondientes con la zona de absorción del 1,3-pentadieno y CO₂ respectivamente.

de la dinámica de adquisición de espectros de un cultivo de *D. fabryi* PR66, desde la apertura de la llave para que los gases del espacio de cabeza entren en la cápsula, hasta el cierre. En esta figura se puede observar cómo existen dos zonas con una mayor intensidad de absorción (flechas), que aumentan progresivamente con el tiempo, y que se corresponden con las regiones de absorción del 1,3-pentadieno y del CO₂ que se indican en la Tabla 5.

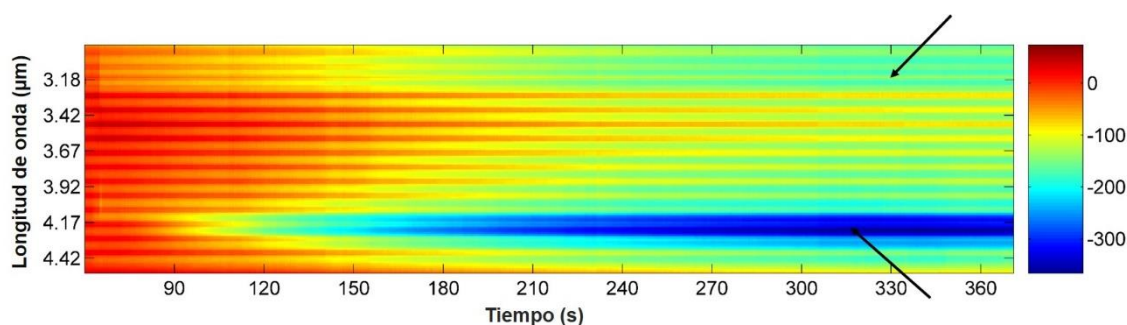


Figura 15. Ejemplo de la dinámica de adquisición de espectros desde la apertura al cierre de la llave de entrada de los gases del espacio de cabeza de un cultivo de la cepa *D. fabryi* PR66 dentro de la cápsula. La escala de color indica el nivel de intensidad de absorción a cada longitud de onda (mayor cuanto más azul). Las flechas indican las dos bandas de absorción que aparecen en la muestra, una correspondiente al 1,3-pentadieno y la otra al CO₂.

2. Análisis no supervisado de los espectros dinámicos MWIR

2.1 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales a partir de la primera derivada de los espectros concatenados mostró que la varianza retenida con los cuatro primeros componentes es del 97,2 %, distribuida de la siguiente forma: el componente principal 1, PC1, recogía el 57,4 %, el PC2 el 31,7, el PC3 el 5,8 y el PC4 el 2,3% de la varianza. Al analizar los *loadings* o contribución de cada longitud de onda en la información que aporta cada uno de los componentes principales, se detectó que, mientras en el componente 1 (no incluido en la Figura 16) la información era aportada por numerosas longitudes de onda sin ser ninguna destacable, en el componente 2 y 3 había una región en cada una de ellas con longitudes de onda relacionadas con las descritas en la Tabla 5 para el 1,3-pentadieno y el CO₂. Como se puede observar en la gráfica superior de la Figura 16, la máxima contribución para el PC2 correspondía a las longitudes de onda entre 4,20 y 4,30 μm que se encontraban dentro del rango de absorción del CO₂ producido por las levaduras (Tabla 5). En cuanto al PC3, en la gráfica del medio de la Figura 16 se observa que hay una contribución, aunque mucho menor que la detectada para la zona del CO₂ en el anterior componente, de longitudes de onda entre 3,15 y 3,3 μm, las cuales se encontraban a su vez

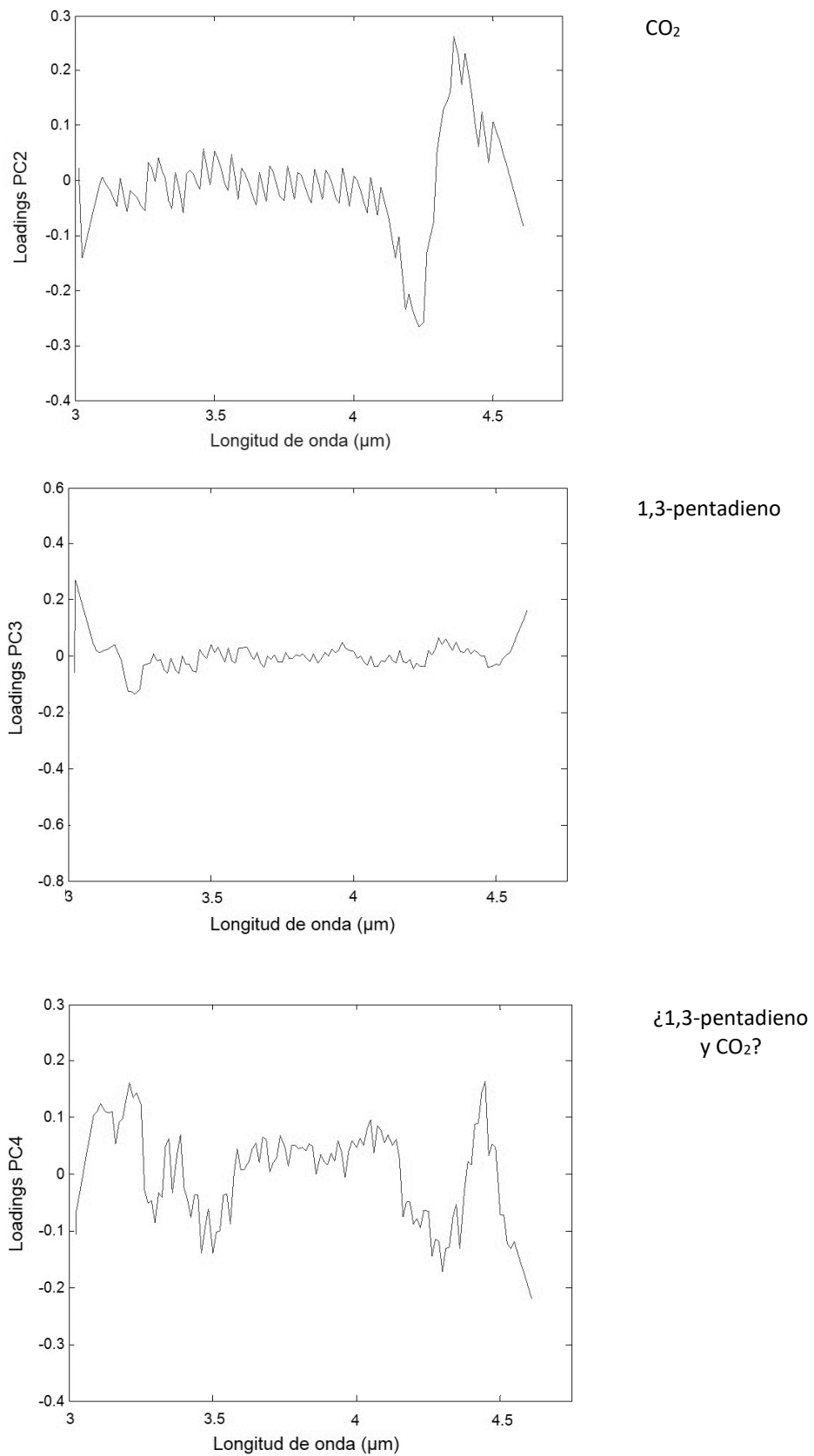


Figura 16. Loadings o contribución de cada una de las longitudes de onda en el componente principal 2 (arriba), 3 (medio) y 4 (abajo) y compuestos sobre los que pueden dar información.

dentro del rango de absorción del 1,3-pentadieno descrito en la Tabla 5 para *D. fabryi* PR66. El componente 4 (Figura 16 abajo), aunque no presenta una clara contribución destacable de un único rango de longitudes de onda, parece que tanto el rango de absorción del 1,3-pentadieno como el del CO₂ pueden estar aportando información.

2.2 Ajuste de primer orden de la dinámica de respuesta de los PCs

Se procedió a la representación de los *scores* o coordenadas que cada espectro individual de la dinámica de las muestras (10⁵ espectros por muestra) toma en el espacio definido por cada uno de esos componentes principales (Figura 17). Como se observa en dicha Figura, el comportamiento dinámico del PC2, PC3 y PC4 de las muestras (cada una de un color) parecía en muchos casos tener una respuesta no lineal de difusión de los gases hacia el dispositivo experimental, por lo que se modelaron con la siguiente ecuación: $a \cdot (1 - e^{(-t/b)})$, obteniéndose el parámetro de a (Figura 18) y R² (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficiente R² del ajuste de la respuesta de primer orden del comportamiento dinámico de la difusión de los gases en el dispositivo experimental según los *scores* del PC2, PC3 y PC4.

R ²	18 ml			9 ml		
	PC2	PC3	PC4	PC2	PC3	PC4
Medio	0	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	> 0,97	> 0,80	> 0,90	> 0,85	< 0,50*	< 0,50
<i>S. cerevisiae</i> EPD 1.1.2	> 0,99	> 0,80	> 0,80	< 0,50*	< 0,50	< 0,5*
<i>D. fabryi</i> PR66	> 0,97	> 0,88	> 0,55	< 0,5*	< 0,5*	< 0,50*
<i>D. hansenii</i> CBS 766	> 0,96	> 0,50	> 0,60	-	-	-

*En algunos casos próximo a 0

Naranja: cepas no productoras de 1,3-pentadieno;

Azul: cepas productoras de 1,3-pentadieno

Como se puede observar en la Tabla 6, el coeficiente de determinación de la respuesta de primer orden del comportamiento dinámico de la difusión de los gases a partir de muestras que solo contenían medio de cultivo, era obviamente de 0 al no presentar ningún tipo de célula microbiana que pudiera producirlos. Las muestras con levaduras que contenían 9 ml de volumen tenían un valor de R² inferior a 0,5 en la mayoría de los casos y en muchos de esos casos el ajuste era próximo a 0. De hecho, el ANOVA realizado sobre los valores de a determinaron que el volumen de cultivo y, por tanto, la cantidad de biomasa celular, tenía un gran efecto estadísticamente significativo ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor= $4,13 \cdot 10^{-6}$) del PC2 adscrito a la producción de CO₂. Esto indicaba que usando 18 ml de volumen se obtenía una mayor señal, a . Lo mismo ocurría con el PC3, adscrito a la respuesta de producción de 1,3-pentadieno ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor=

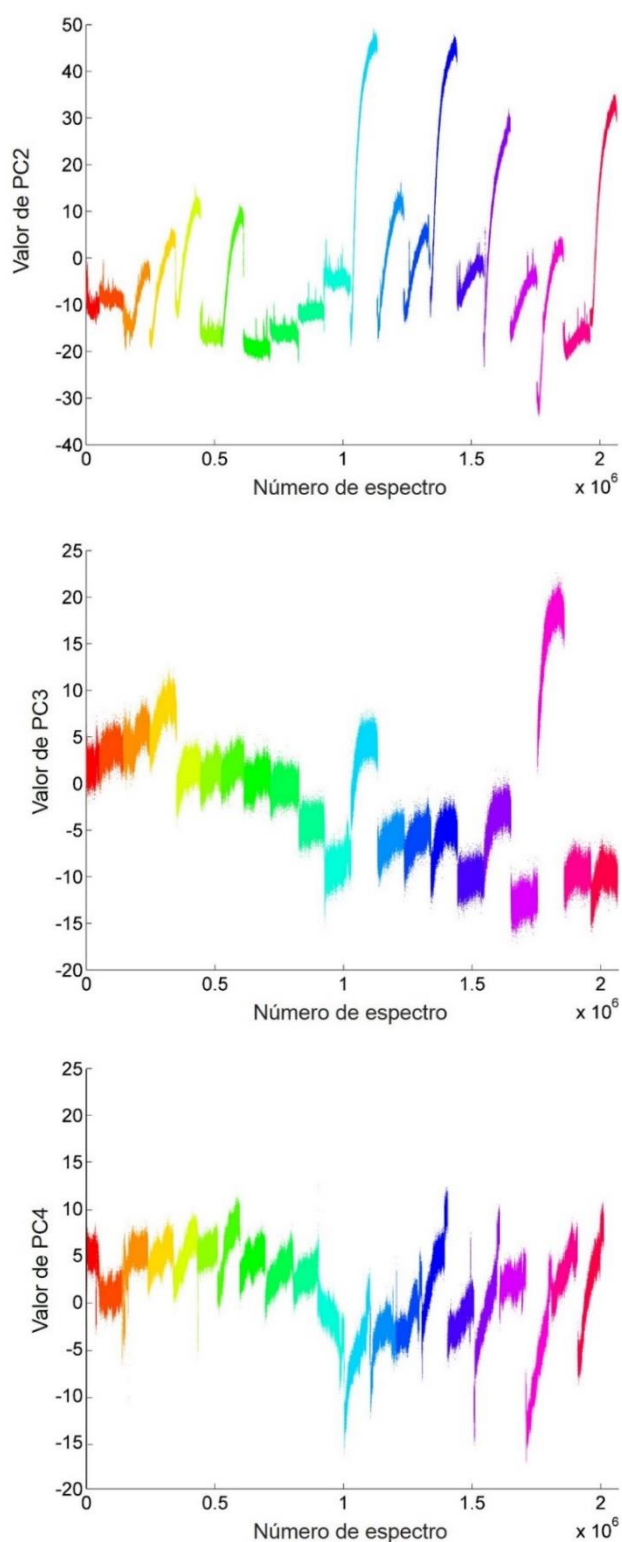


Figura 17. Representación de los *scores* o coordenadas que cada espectro individual de las muestras (10^5 espectros por muestra (representados por puntos), y cada muestra en un color) toma en el espacio definido por cada uno de los componentes principales, 2 (arriba), 3 (en medio) y 4 (abajo).

$5,95 \cdot 10^{-4}$). Por ello, con el objetivo de obtener resultados más óptimos, únicamente se trataran las muestras que contenían 18 ml de volumen.

El gráfico del PC2 de la Figura 18 pone de manifiesto que las cepas de *Saccharomyces* (S.) tienen un mayor nivel de intensidad de producción de señal de CO₂ ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor = $5,02 \cdot 10^{-5}$) que las cepas *Debaryomyces* (D.). El nivel máximo de respuesta en las cepas de *Saccharomyces* se sitúa entre 40 a 60 unidades de intensidad, mientras que cepas de *Debaryomyces* el nivel de respuesta está en torno a 25-30 unidades. Como era de esperar, la ausencia de CO₂ en la muestra de medio hace que apenas se detecte señal en ella.

En cuanto a la respuesta de producción de 1,3-pentadieno, adscrita al PC3, el coeficiente de determinación R^2 del ajuste de los *scores* a una respuesta no lineal es ligeramente peor (Tabla 6) que para el CO₂ con el PC2. El nivel de señal en PC3 era mucho menor (Figura 18) (de 6 a 10 veces) que para el CO₂, dando una idea de las diferencias de producción metabólicas de ambos gases. En el gráfico del PC3, se observa que las cepas productoras

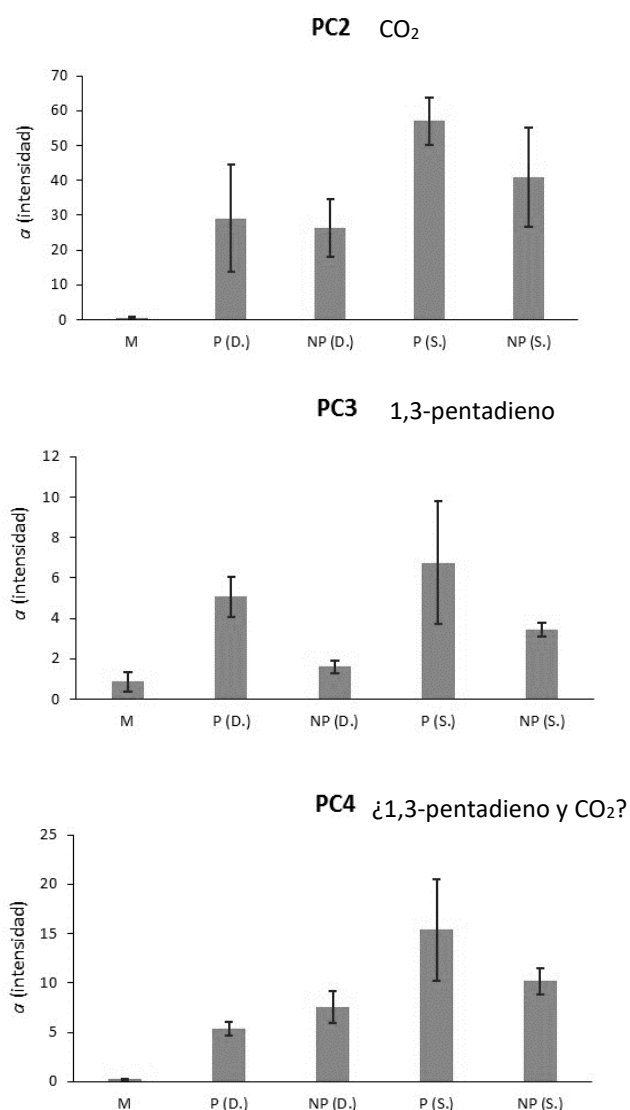


Figura 18. Valores de α (nivel máximo de intensidad) de la respuesta de primer orden del comportamiento dinámico de la difusión de los gases en el dispositivo experimental según los scores del PC2, PC3 y PC4. Las barras indican la desviación típica de cada valor. M: medio de cultivo; P: cepa productora de 1,3-pentadieno; NP: cepa no productora de 1,3-pentadieno; D.: cepa de *Debaryomyces*; S.: cepa de *Saccharomyces*.

árbol de segregación que aparece en la Figura 19. Este análisis divide las muestras inicialmente en dos grandes grupos principales ligado a la capacidad de producción de CO₂, las mayores productoras por un lado y por el otro las menores o no productoras de CO₂. Dentro del primer grupo están mayoritariamente las muestras de las dos cepas usadas de *Saccharomyces*, y dentro del segundo mayoritariamente *Debaryomyces* y el medio. Dentro de esta división principal, las

(P) tanto de *Saccharomyces* como de *Debaryomyces* presentaban un mayor nivel de señal que las cepas no productoras (NP) ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor= $1,1 \cdot 10^{-4}$). El nivel de señal máximo detectado estaba cerca de 5 en *Debaryomyces* y casi 7 en *Saccharomyces*. Sin embargo también se detecta señal en las cepas no productoras y en el medio de cultivo, aunque con un peor ajuste, o nulo como en el caso del medio.

En cuanto a la respuesta del PC4 (Figura 18), aunque no sobrepasa los 15 puntos de intensidad de respuesta, las cepas de *Saccharomyces* tienen intensidades superiores a las de *Debaryomyces* ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor= $3,3 \cdot 10^{-4}$), indicando probablemente una mayor influencia de las longitudes de onda del CO₂.

2.3 Análisis de clúster

Tras el análisis de clúster no supervisado utilizando el método de Ward y la distancia Euclídea con los datos de intensidad de señal máxima, α , del PC2, PC3 y PC4, se obtuvo el

muestras correspondientes al medio de cultivo se agrupan dentro de las de menor producción de CO₂, y las muestras productoras y no productoras de 1,3-pentadieno estarían distribuidas en los dos grupos de la división principal. A cada muestra, este análisis asigna un número de clúster, obteniéndose hasta 5 clústers en este estudio.

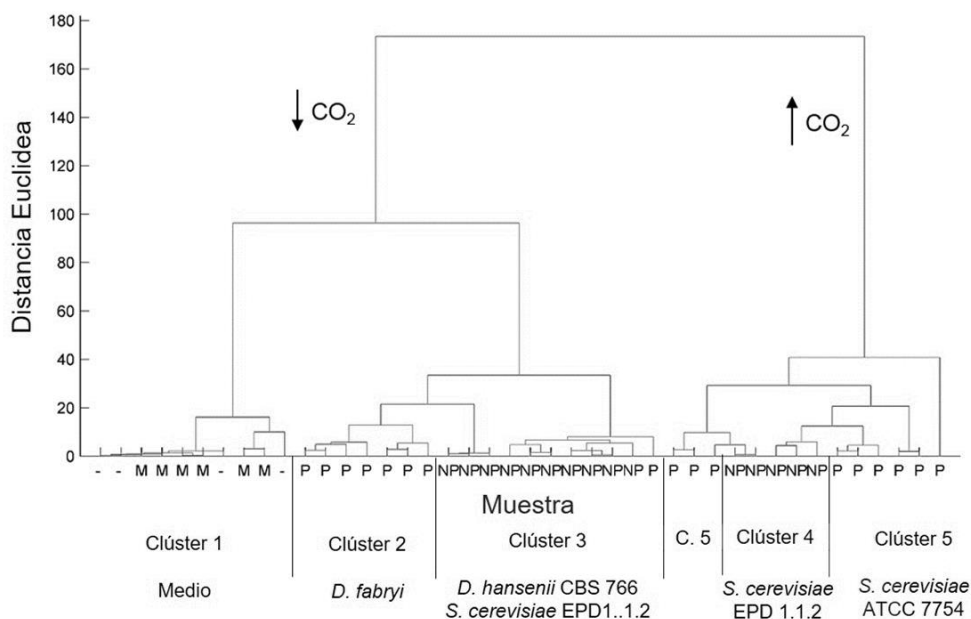


Figura 19. Análisis de clúster jerárquico de las muestras basado en los valores de intensidad máxima de señal, α , obtenido en el ajuste no lineal de los *scores* de los espectros dinámicos del PC2, PC3 y PC4. Se realizó utilizando el método de Ward y la distancia Euclídea. También aparecen indicadas los grupos o clúster en los que se dividen las muestras junto con las especies que incluyen. M: medio; P: cepa productora de 1,3-pentadieno; NP: cepa no productora de 1,3-pentadieno.

Dentro de la división de poco o no productoras de CO₂, el medio, que no presenta ni CO₂ ni 1,3-pentadieno se encuentra en una subdivisión (clúster 1) y en la otra subdivisión, las muestras productoras de 1,3-pentadieno de *D. fabryi* (clúster 2) y por otro lado las muestras no productoras de 1,3-pentadieno, pero sí de CO₂ de *D. hansenii* y *S. cerevisiae* (clúster 3). La segunda división principal únicamente contiene muestras de cepas de *Saccharomyces* altamente productoras de CO₂, aunque no se encuentran separadas completamente en el dendrograma de la Figura 19, las muestras de *S. cerevisiae* EPD 1.1.2 que están en el clúster 4 y las de *S. cerevisiae* ATCC 7754, que son las productoras de 1,3-pentadieno, situadas en el clúster 5.

Teniendo en cuenta los valores de α para todos los componentes principales, la división de las muestras en los 5 clústers que propone el análisis, son estadísticamente significativas ($F > F_{\text{crítico}}$)

y P-valor= 3E-7). La subdivisión principal en función de la producción de CO₂ entre altas productoras de CO₂ (clúster 4 y 5) y bajas o no productoras de CO₂ (clúster 1, 2 y 3) también es altamente significativa ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor= 2,2E-7). Lo mismo ocurre con la clasificación de las muestras entre productoras de 1,3-pentadieno (clúster 2 y 5) y las no productoras de 1,3-pentadieno (clúster 1, 3 y 4) ($F > F_{\text{crítico}}$ y P-valor= 4E-3), aún a pesar de que visualmente en el dendograma no presenten una clara división y presente 4 órdenes de magnitud menor de significación que la clasificación en función de la producción de CO₂. Observando el nivel de significación, este tipo de análisis de clústers sería más idóneo para la detección de las muestras con un metabolismo muy productor de CO₂.

3. Análisis supervisado de los espectros dinámicos MWIR

3.1 Análisis discriminante

La Figura 20 muestra la proyección en el plano canónico de la media de los 2000 últimos espectros (cuadrados) de la señal dinámica de cada muestra, así como de la posterior proyección de todos los espectros individuales alrededor de ella (puntos en color). Las variables canónicas con las que se consigue la clasificación de los espectros, son combinaciones lineales de las siguientes longitudes de onda (μm): 3,21; 3,31; 3,46; 3,71; 3,88; 4,12; 4,17; 4,19; 4,27; 4,37; 4,51. Las tres primeras son longitudes de onda del rango de absorción del 1,3-pentadieno, y desde 4,12 hasta 4,27 del CO₂. En la Figura 21 se muestra el coeficiente con el que contribuye cada una de ellas, cuanto más próximas a 0, menor es su contribución. Algunas longitudes de onda contribuyen por igual a ambas variables canónicas, como a 3,46 μm y el resto contribuyen más a una que a otra. Las longitudes de onda que pertenecen a los rangos de absorción del 1,3-pentadieno o al CO₂ son las que presentan mayores coeficientes de contribución. Por tanto, dichas bandas de absorción, también parecen ser las más influyentes en diferenciar los espectros siguiendo un análisis discriminante.

Las dos funciones discriminantes (líneas negras punteadas de la Figura 20) que separan los distintos grupos tienen las siguientes ecuaciones: 1) $y = 1,66x - 7,66$; 2) $y = -12,35x + 18,35$ (desde 1 a infinito); donde x e y son respectivamente la primera y la segunda variable canónica.

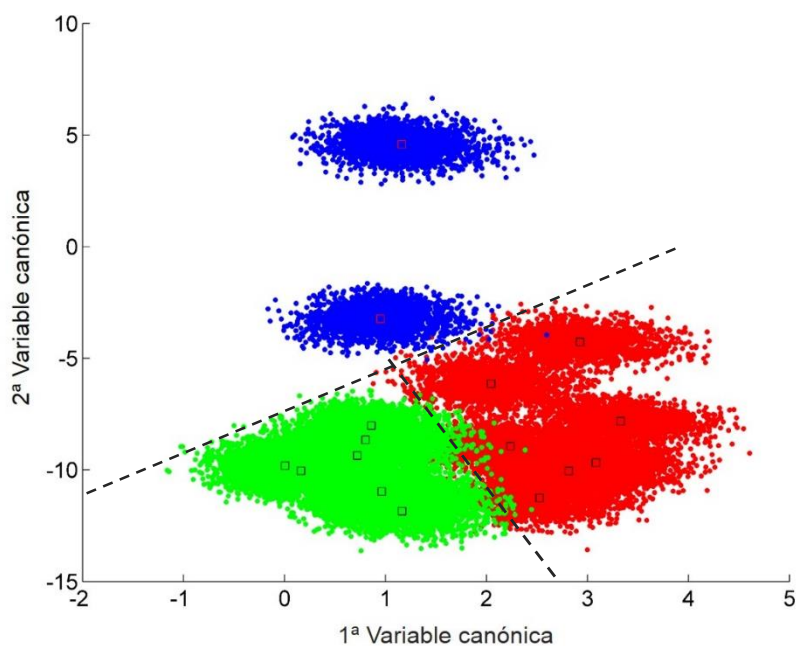


Figura 20. Análisis discriminante de la media de los 2000 últimos espectros de las muestras (cuadrados grises) y posterior proyección de los espectros individuales (puntos) sobre el plano canónico definido por las medias. Las líneas negras discontinuas son las funciones discriminantes que separaran las muestras en diferentes grupos: puntos azules, medio; puntos rojos, no productoras de 1,3-pentadieno y puntos verdes, productoras de 1,3-pentadieno.

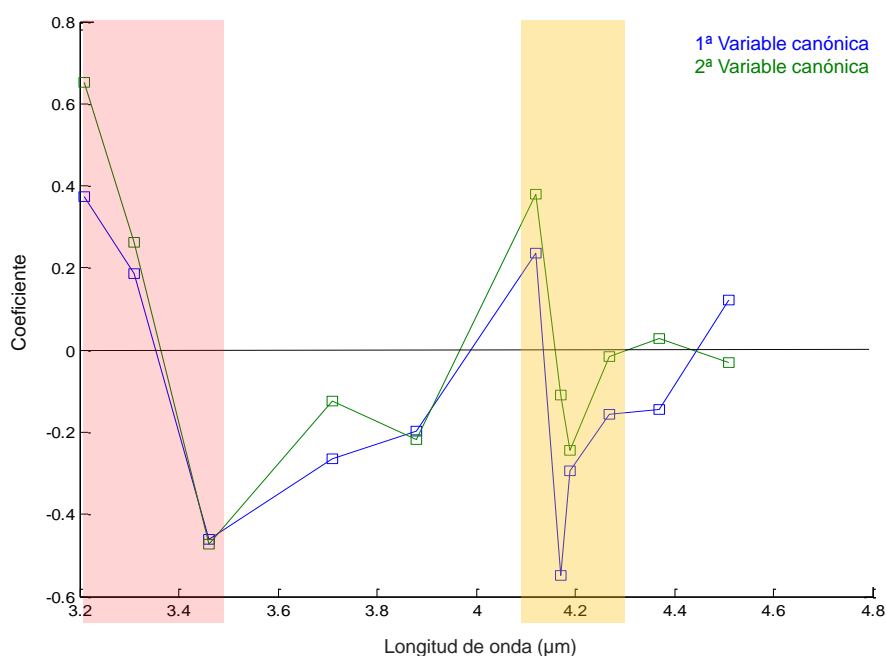


Figura 21. Coeficientes con los que contribuyen las longitudes de onda en las variables canónicas para la clasificación de los espectros, la primera en azul y la segunda en verde. En rosa y naranja aparecen resaltas las longitudes de onda a las que se detecta el 1,3-pentadieno y el CO₂ respectivamente.

Tanto las variables canónicas como las funciones discriminantes se hallaron con las medias de los 2000 espectros de cada muestra y después se proyectaron los espectros individuales (puntos individuales alrededor de cada media de la Figura 20). Con estas funciones discriminantes y las variables canónicas, se consiguió clasificar o segregar los espectros de las diferentes muestras (98 % de espectros individuales bien clasificados y un 2 % mal clasificados, pero un 100 % de los espectros medios bien clasificados) en productoras de 1,3-pentadieno (verdes), no productoras de 1,3-pentadieno (rojo) y medio (azul).

3.1.2 Optimización del análisis dinámico

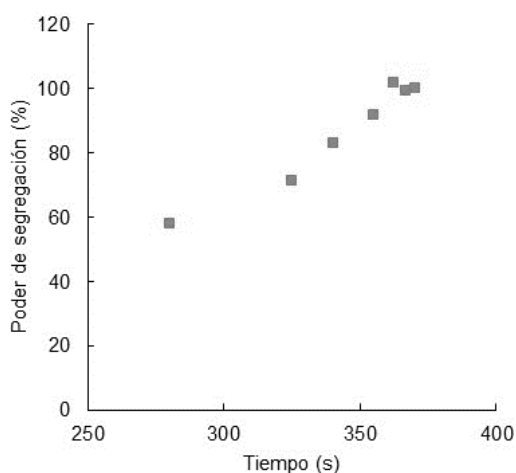


Figura 22. Poder de segregación de los espectros, obtenido a partir del área de los centroides provenientes de la proyección de los espectros medios de diferentes tiempos de la grabación dinámica en las variables canónicas definidas por análisis discriminante. Se han utilizado espectros desde los 280 segundos en adelante de la grabación dinámica.

El área del triángulo formado entre los centroides de las diferentes clases o grupos (provenientes de la proyección de los espectros medios de diferentes tiempos de la grabación dinámica en las variables canónicas definidas anteriormente) resulta indicativa del poder de discriminación de los espectros en cada tiempo (Figura 22). Éste aumenta desde el 55 % a los 280 segundos, hasta el 100 % o máximo poder de segregación a los 360 segundos. Los resultados indican que los tiempos utilizados para analizar la clasificación de las muestras (360-370 segundos) son los adecuados y suficientes para que todo el gas ya haya difundido al interior de la cápsula y nos permita clasificar las muestras.

DISCUSIÓN

Dos de los signos más importantes que anticipan que en un alimento o bebida se ha producido el crecimiento y el consecuente deterioro por levaduras son la aparición de burbujas o el hinchamiento de los envases debido a la producción de CO₂ y, por otro lado, la presencia de olores y sabores desagradables al abrir los productos (Stratford, 2006). Básicamente, este tipo de problemas se tratan de evitar con los tratamientos físicos y químicos de las materias primas o productos terminados (Stratford, 2006; Deák, 2008; Torres et al., 2016). Una vez que aparecen dichos problemas, el aislamiento, cuantificación e identificación del microorganismo contaminante y resistente a estos tratamientos, no siempre es la solución más adecuada, ya que la capacidad deteriorante no es una propiedad de especie, si no de cepa (Wrent et al., 2010). La detección temprana de los problemas de deterioro mediante la localización de productos metabólicos derivados de la acción de las levaduras, supondría una herramienta importante para el control de calidad de los mismos (Loureiro y Querol, 1999) que evitaría los consecuentes problemas económicos que pueden acarrear en las industrias alimentarias.

Respecto a la producción de malos olores y sabores en alimentos, Ridgway et al., en 2010 desarrollaron una lista con casi 40 tipos de olores, muchos de los cuales eran debidos a la acción microbiana. Entre ellos destaca el 1,3-pentadieno como ya hemos comentado. Este compuesto es un ejemplo de cómo en algunos casos, la incorporación en los alimentos de un tratamiento químico, como es la adición de conservantes del grupo de los sorbatos, con el fin de prevenir la aparición del crecimiento de microorganismos deteriorantes, puede conllevar precisamente a la generación de problemas de deterioro, debido a su conversión en 1,3-pentadieno por ciertos hongos y levaduras. Aunque la detección sensorial del 1,3-pentadieno es factible (Casas et al., 1996) (Capítulo 2), para una correcta identificación y cuantificación, se necesita un análisis cromatográfico (Ridgway et al., 2010). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la técnica de espacio de cabeza es la solución tecnológica que se ha empleado y se emplea para detectar 1,3-pentadieno en alimentos y bebidas (Marth et al., 1966; Liewen y Marth, 1985; Casas et al., 1999, 2004; Pinches y Apps, 2007; Nieminen et al., 2008; Plumridge et al., 2010; Gürbüz, 2011). La GC-MS es una tecnología costosa para su empleo en el análisis rutinario de calidad de los laboratorios de las industrias alimentarias debido al elevado coste del aparato, la necesidad de tener personal cualificado, el tiempo que conlleva, además de los métodos de extracción de volátiles que en algunos casos es necesario utilizar previamente para poder inyectar la muestra en el cromatógrafo. La utilización de laboratorios externos para

realizar este tipo de análisis cromatográfico también implica ciertos costes que en muchos casos las industrias no pueden permitirse. Por eso las industrias alimentarias demandan de alternativas tecnológicas adecuadas y baratas que les ayuden a detectar y rechazar a tiempo lotes con este problema de deterioro por 1,3-pentadieno y otros gases malolientes.

Los analizadores de gases infrarrojos tienen la reputación de ser una tecnología compleja, incómoda y cara. De hecho, en las principales revisiones de técnicas de análisis de malos olores en alimentos (Parker et al., 2015; Ridgway et al., 2010) no se cita la espectroscopía de infrarrojo como técnica a utilizar. Sin embargo el rápido progreso de ordenadores para el análisis de los datos (Raichlin y Katzir, 2008) junto con el aumento de la demanda de analizadores de gases ha provocado un auge de la tecnología infrarroja. La tecnología MWIR empleada en este estudio además de ser una tecnología relativamente barata (<10000 €, detector y lámpara) presenta un gran interés tecnológico por tres razones. La primera, que la mayor parte de los objetos emiten en este rango (3–5 μm), lo que se aplica a visión nocturna e imagen termográfica (Vergara et al. 2007). La segunda, la mayor parte de las moléculas químicas tienen una huella de absorción característica en el IR debido a los procesos de absorción asociados a la frecuencia de vibración de los enlaces entre los átomos de las moléculas, lo que origina que los sensores IR jueguen un papel muy importante en la detección de gases (Chou, 2000). La tercera: una serie de ventajas añadidas con respecto a otras tecnologías: es una tecnología rápida, fácil de utilizar, no necesita tratamiento o preparación previa de la muestra, suelen ser equipos portátiles, permite obtener imágenes en tiempo real (hasta 2000 imágenes/segundo), alta velocidad de respuesta (microsegundos), las muestras no necesariamente entran en contacto directo con el detector, por lo que se permite su uso hasta con gases corrosivos o invasivos y no necesitan mantenimiento. Al no requerir contacto con la muestra, los ensayos pueden ser no destructivos y no invasivos permitiendo su aplicación con cultivos celulares o *in vivo* sin que éstos se vean dañados (Gómez-Carracedo et al., 2003; Raichlin y Katzir, 2008; Gowen et al., 2010; Linares-Herrero, et al., 2012).

En este estudio se propone la utilización de un dispositivo MWIR sensible en el rango espectral del infrarrojo medio, entre 3 y 4,6 μm , para la detección de muestras con y sin el compuesto 1,3-pentadieno en su espacio de cabeza, procedente de la descarboxilación de sorbatos presentes por ciertas levaduras. Este dispositivo es capaz de detectar sorbato potásico y 1,3-pentadieno puro en soluciones acuosas. El rango de absorción de ambos compuestos es prácticamente idéntico, entre 3,10 y 3,45 μm y el centro del mismo se sitúa en torno a 3,30. Estos datos coinciden con las longitudes de onda de absorción de la vibración de estiramiento

de los enlaces de los alquenos, =CH (3,22-3,33 μm). La única diferencia entre el sorbato y el 1,3-pentadieno es la presencia de un grupo carboxilo en el sorbato, que solo sería detectable a longitudes de onda por encima de las que detecta este sistema MWIR, 5,74-5,81 μm (Ghosh y Jayas 2009). Además, la detección de uno cuando está presente el otro no causa ningún problema debido a la gran diferencia de volatilidad entre ambos compuestos, siendo la presión de vapor a 25°C del orden de KPa en el 1,3-pentadieno y de Pascales (Pa) en el Sorbato potásico o ácido sórbico, lo que hace que a esa temperatura, cercana a la de incubación de las muestras, el conservante se encuentre en forma líquida (Stopforth et al., 2005; ICSC 1722 (1,3-Pentadiene); ICSC 1284 (Sorbic Acid); CAS N°: 504-60-9 (1,3-Pentadiene); CAS N°: 24634-61-5 (*Potassium Sorbate*)). La diferencia entre los rangos de absorción de los compuestos líquidos y gaseosos puede deberse a desplazamientos del pico de absorción por las interacciones por puente de hidrógeno que tiene el agua en los compuestos en líquido (Fecko et al., 2003; Stuart, 2004).

Una ventaja del sistema MWIR empleado es que es capaz de reconocer muestras incluso cuando éstas tienen bajas concentraciones de 1,3-pentadieno tanto del compuesto puro como del producido por los cultivos de levaduras, concentraciones incluso por debajo del valor umbral sensorial de este compuesto en humanos, que se estableció en 2,5 ml/l en salmueras y en 4 mg/Kg en queso (Saxby, 1993). Con otro compuesto de un olor también característico a petróleo, el estireno, el valor umbral sensorial se ha establecido mucho más bajo, entre 0,15 y 25 ppm, siendo ya reconocido en aire a 0,05 ppm (Fazzalari et al., 1978; Ruth, 1986). El sistema MWIR, también podría detectar la presencia de estireno porque los movimientos vibratorios de estiramiento de los enlaces del anillo aromático absorben entre 3,22 y 3,33 μm (Ghosh y Jayas 2009).

A raíz de otros estudios se sabe que en levaduras la producción de 1,3-pentadieno normalmente es muy baja, no llegando a descarboxilar más de un 1 % del ácido sórbico o sorbato presente (Casas et al., 2004; Stratford et al., 2007). A diferencia de en estos medios experimentales, en alimentos se ha llegado a cuantificar hasta 5000 mg/l y, aunque no se especifica, probablemente sea debido a la acción fúngica, ya que ciertas especies de hongos son capaces de convertir en 1,3-pentadieno el 100 % de la cantidad de los sorbatos (Plumridge et al., 2010). Pese a que con el sistema MWIR no hemos realizado una estimación cuantitativa formal, se ha observado que el nivel máximo de intensidad de los scores del PC3 de los espectros de los cultivos analizados es mayor en las cepas productoras de 1,3-pentadieno, concretamente más alto en *S. cerevisiae* ATCC 7754 que en *D. fabryi* PR66, opuesto a los resultados reales de cuantificación cromatográfica (Capítulo 2). Esto podría ser indicativo de que otros compuestos producidos por

el metabolismo microbiano de las células, tal como el CO₂, alcohol, glicerol, etc., especialmente en *S. cerevisiae*, podrían interferir en la detección de la señal por el sistema MWIR. El CO₂ tiene longitudes de onda de absorción en torno a 4,3 μm (Chou, 2000), pero el enlace –OH de los alcoholes tiene un movimiento vibratorio de estiramiento que absorbe entre 2,77 y 3,12 μm (Stuart, 2004; Ghosh y Jayas, 2009) y se sitúa más cerca del ancho de bandas identificado para el 1,3-pentadieno, de forma que en esta zona, además de este compuesto también se podría estar detectando el etanol producido fermentativamente.

Para la detección de 1,3-pentadieno en el espacio de cabeza de los cultivos hemos realizado un análisis dinámico de los espectros durante los 5 minutos de conexión de los cultivos a la cápsula. Tras el PCA y el ajuste lineal de los *scores* del componente principal 3, el valor alto de a era indicativo de aquellas muestras que contenían 1,3-pentadieno. Sin embargo, también había señal, aunque con un peor ajuste debido a una tendencia más lineal, en las muestras de cepas no productoras. En estas muestras, aunque más en *S. cerevisiae*, también se podría estar detectando, como se ha indicado anteriormente, la producción de etanol. Aun así, el análisis de clúster no supervisado empleando el valor de a de todos los PCs para cada muestra (Figura 19), originó que en 2 de los 5 clústers totales, se diferenciaron las dos especies productoras de 1,3-pentadieno, el 2 que incluye a *D. fabryi* PR66 y el 5 a *S. cerevisiae* ATCC 7754. Este procedimiento (PC de los espectros de la dinámica, ajuste no lineal de los *scores* del PC2, PC3 y PC4 obteniendo el valor de a y por último un análisis de clúster con todos los valores de a) sería la forma propuesta para analizar las muestras sin tener una orientación previa si en ellas hay o no producción de 1,3-pentadieno, además de para poder diferenciar especies productoras de 1,3-pentadieno. Si por el contrario, ya se tiene previamente una orientación en las muestras de si hay o no producción de 1,3-pentadieno, y lo que se quiere es cerciorarse de ello sin utilizar GC-MS, basta con grabar los últimos 5 segundos de la grabación dinámica y, con la media de sus espectros, realizar un análisis discriminante. En este análisis, con dos funciones discriminantes y empleando dos variables canónicas como combinaciones lineales de las longitudes de onda más influyentes en generarlos, entre a las que absorbe el 1,3-pentadieno, se consigue clasificar correctamente el 100 % de las medias de los espectros o el 98 % de los espectros individuales de cada muestra.

Como se observa en las Figuras 12 y 14, la señal que genera el equipo MWIR presenta mucha deriva debido a la no refrigeración del mismo (Piñeiro-Ave et al., 2014). Los espectros generados tienen una gran cantidad de ruido, ya que los detectores están agrupados en grupos de 11, por lo que se requiere un pretratamiento de los mismos para evitarlo. Para ello se utilizó el algoritmo

de Savitsky Golay y, tomando como un ancho de ventana de 11 píxeles, conseguimos una señal más suavizada a la que aplicar una primera derivada. Después, tanto en sensores o narices electrónicas como en espectrometría de infrarrojos, los datos generados son siempre procesados por métodos quimiométricos supervisados o no. El análisis de componentes principales es una de las técnicas más empleadas de preprocesamiento de los espectros o señales de sensores para clasificar o diferenciar grupos de manera no supervisada (Karoui et al., 2010). Con esta técnica se reduce el rango de datos en nuevas variables que explican las diferencias entre los *scores* de las muestras. En nuestro caso, la representación gráfica del comportamiento dinámico de los *scores* del PC2, PC3 y PC4 reveló un patrón de respuesta no lineal de primer orden, correspondiente a la liberación de los gases en la cápsula y, según los *loadings* del mismo, el PC2 contenía claramente información relacionada con la zona de absorción del CO₂ y del mismo modo el PC3 con el 1,3-pentadieno. Sinelli et al., (2008) de igual forma utilizaron el NIR y MIR para detectar diferentes tipos de harinas, asociándolas con las diferentes formas de las curvas obtenidas con los *scores* del PC1 y PC2 a lo largo del tiempo. En nuestro estudio además, la combinación de PCA con análisis de clúster, o el uso de LDA, nos ha permitido diferenciar muestras con 1,3-pentadieno de las que no lo contenían. Un estudio parecido a este es el de Fudge et al., en 2011. En ese estudio se consiguió clasificar un 60 % de los vinos controles y un 70 % de los vinos “ahumados” correctamente en función de la presencia de los marcadores guaiacol y 4-metilguaiacol. Para ello también emplearon a partir de los espectros MIR, una combinación de LDA y PCA, cuyos *loadings* recaen en regiones de absorción de grupos característicos de estos compuestos. En algunas variedades de vinos, se consiguió hasta un 100 % de vinos correctamente clasificados.

No existen referencias del uso de la tecnología MWIR para la detección de gases en alimentos, pero si para detectar VOCs ambientales, como metano o etileno (Naranjo y Baliga, 2012), derivados de petróleo o fugas de combustible (Williams et al., 2006; Cetin y Akers, 2011; Linares et al., 2015). El 1,3-pentadieno, puede ser liberado a la atmósfera durante la combustión de biomasa, incineradores de residuos o en los gases de escape de los motores de gasolina y diésel (Hampton et al., 1982; Wilkins y Larsen, 1996). Además, el 1,3-pentadieno es un monómero que se usa en la fabricación de plásticos, adhesivos y resinas (CAS N°: 504-60-9). De ahí la importancia de la patente que incluye el uso de los genes de levaduras implicados en su producción para sintetizar de forma renovable hidrocarburos (Leys et al., 2015). Estudiando posibles marcadores de cáncer de pulmón, también se ha descrito la presencia de 1,3-pentadieno, al igual que el estireno, en el aire exhalado de personas fumadoras, algunas de ellas con cáncer de pulmón (Rudnicka et al., 2011; De Lacy Costello et al., 2014). Por todo ello, la aplicación del equipo MWIR

utilizado para la diferenciación de muestras con 1,3-pentadieno no solo podría tener una aplicación en la industria de los alimentos, si no que a nivel clínico, y a nivel ambiental, también podría tener aplicabilidad.

Para su aplicación en la industria alimentaria, se necesita una validación externa de los resultados con más muestras y especies (tanto productoras como no productoras de 1,3-pentadieno), así como la realización de pruebas para lograr superar las posibles interferencias debido a los materiales de plástico o los recipientes de los alimentos. Estos compuestos orgánicos podrían tener bandas de absorción en el mismo rango que el 1,3-pentadieno. En este caso, se podría realizar una “ventana” en el recipiente para el muestreo, aunque la mejor solución sería aquella que no requiera sacar el espacio de cabeza fuera del envase, con el fin de mantener la ventaja del posible uso como técnica no destructiva.

Adicionalmente a la detección de 1,3-pentadieno en las muestras, el uso de diferentes especies de levaduras con diferentes metabolismos, nos ha permitido, sin ser un objetivo inicial, obtener información acerca de la producción de CO₂ de las levaduras utilizadas con el dispositivo MWIR, ya que el CO₂ es uno de los principales gases del metabolismo de las levaduras (Fleet, 2011). La zona de absorción de uno de los movimientos vibratorios de estiramiento de los enlaces del CO₂ se sitúa en torno a los 4,2-4,3 μm (Schädle et al., 2016), el cual se sitúa dentro del otro rango de absorción, diferente al de 1,3-pentadieno, detectado en los cultivos de levaduras. Los *loadings* del PC2 señalaban que en las longitudes de onda entre 4,15 y 4,30 había una fuerte señal de CO₂ y tras el ajuste no lineal de la dinámica del PC2, se obtuvieron los mejores R² (> 0,96) correspondientes al proceso de liberación del CO₂ dentro de la cápsula. Los *loadings* del PC4, aunque no tan claramente, también señalaban una fuerte contribución de las longitudes de onda de absorción del CO₂. Del análisis de los valores de nivel máximo de intensidad señal del ajuste, α , se deducen dos características. La primera, el nivel de señal de CO₂ en el PC2 era mucho mayor, del orden de 6 a 10 veces, que para la señal de 1,3-pentadieno en el PC3 (Figura 18, PC3) y en segundo lugar, que las cepas de *Debaryomyces* tienen una menor producción de CO₂ que las de *Saccharomyces* ya que es de aproximadamente 25 en las primeras y 60 en las segundas, (Figura 18 del PC2). El posterior análisis de Clúster en función de los valores de α de los tres PCs, destacó también una clara división inicial entre cepas o muestras con mucha producción de CO₂, donde se encontraba *Saccharomyces cerevisiae* y la otra división con *Debaryomyces* y el medio. La producción de CO₂ por levaduras es el resultado de la fermentación de azúcares, pero la cantidad de gas generado varía dependiendo de las especies (Stratford, 2006). *S. cerevisiae* es una especie Crabtree positiva presentando un metabolismo estrictamente fermentativo a altas

concentraciones de glucosa independientemente de si en el medio hay o no oxígeno (Van Urk et al., 1990), sin embargo, *Debaryomyces* únicamente presenta un metabolismo fermentativo cuando se agota el oxígeno (Neves et al., 1997).

Actualmente la detección del CO₂ en el espacio de cabeza es una práctica habitual en la industria alimentaria, sobre todo en aquellos alimentos que se envasan en atmósferas modificadas, inyectando CO₂ o una combinación con otros gases (Church y Parsons, 1995). Las industrias utilizan normalmente medidores de gas basados en sensores electroquímicos para medir el O₂ y sensores electroquímicos, ópticos o detectores de infrarrojos para el CO₂ (Puligundla et al., 2012). Con estos dispositivos se mide el espacio de cabeza de ciertos productos envasados retirados aleatoriamente de la línea de producción, a los cuales se le inserta una aguja que toma una muestra de este espacio con una bomba y lo conduce al equipo de análisis. También existen analizadores de gas en línea que analizan el flujo inicial de los gases que se inyectan en los envases y, tanto en línea como retirando ciertos productos, también hay sensores para detectar fugas de los envases. Con la tecnología MWIR empleada en este estudio y utilizando filtros específicos para las longitudes de onda absorción del CO₂ y tras su automatización, podrían suponer el inicio de una tecnología no destructiva y sin contacto directo con el gas, a diferencia de las anteriormente mencionadas, para analizar en línea diferentes procesos en las industrias alimentarias: el mantenimiento o decremento de la concentración de CO₂ en productos envasados en atmósferas modificadas, el aumento de la concentración de CO₂ en productos con indicios de deterioro por crecimiento microbiano, el control de la concentración del CO₂ en las industrias de bebidas y también el aumento del CO₂ en aquellos procesos de fermentación (Zosel et al., 2011).

Hoy en día no existe ningún estudio en el que se apliquen espectrómetros MWIR para la detección de CO₂ de alimentos. Esta tecnología sí se ha empleado para la detección del CO₂ ambiental y fugas en las industrias de petróleo y gas. Scharf et al., (2009) usó un microespectrómetro basado en FT-MIR con fibras ópticas para detectar y cuantificar gases del cambio climático como el CH₄ o el CO₂. En este estudio, se obtuvieron dos bandas de absorción del CO₂, en 4,25 μm, como en nuestro estudio, y en 2,67 μm. La segunda se corresponde con la longitud de onda de transiciones vibratorias rotacionales de los enlaces de la molécula, pero que no detectamos en nuestro estudio porque está fuera del rango LVF del dispositivo. En las aplicaciones atmosféricas se elige esta última longitud de onda para detectar el CO₂ ya que minimiza la interferencia de las transiciones de las moléculas de agua (Joly et al., 2007). En las aplicaciones para detectar fugas de combustible y CO₂ en industrias de petróleo y gas con MWIR

de camino abierto, son capaces de detectar su presencia hasta en concentraciones de ppm (Naranjo y Baliga, 2012). Por último, aunque las cantidades de CO₂ no son comparables a las obtenidas por el metabolismo microbiano, tanto este mismo sistema MWIR como fibras ópticas son utilizados para ver la dinámica y la concentración del CO₂ emitido por reacciones de combustión, por ejemplo del turborreactor de aeronaves (Linares-Herrero et al., 2013), y en vehículos de motor diésel (Mulrooney et al., 2007).

Aunque para validar nuestros resultados se necesita aumentar el número de muestras y especies estudiadas, este trabajo supone la utilización por primera vez de un sistema MWIR para la posible detección de productos metabólicos gaseosos procedentes de la actividad microbiana. Este sistema junto a un sencillo análisis quimiométrico asociado y automatizable que abarca diferentes técnicas, podría diferenciar alimentos con un alto y un bajo contenido de CO₂, así como aquellos con una fuerte absorción en 3,15-3,30 μm, debido a olores tipo petróleo entre otros. Posteriormente, habría que analizar la influencia que ejercerían los envases en la absorción del sistema y la posibilidad de utilizar filtros específicos para solventarlos. Pero una vez superada esta barrera, este equipo se podría aplicar de manera no destructiva en la línea de producción de los alimentos como una alternativa barata para la detección temprana de estos metabolitos antes de que los productos lleguen al consumidor. También su aplicación podría extenderse a todos aquellos procesos donde se necesite detectar CO₂ en la industria alimentaria.

DISCUSIÓN GENERAL

La producción a gran escala y distribución internacional de alimentos hace que aumente la necesidad de conservantes como el ácido sórbico y sus sales, para garantizar la calidad de los mismos (Stratford, 2006). El uso de este tipo de conservantes en alimentos cuando interactúan en el mismo producto con levaduras lleva implícito varios riesgos a asumir por los fabricantes. El primero de ellos, es la posible aparición de cepas de levaduras (y también de hongos) contaminantes resistentes a ácidos sórbico y sus sales, especialmente de las especies descritas como más resistentes y en las que se han estudiado con mucha profundidad los mecanismos subyacentes (Piper, 2011). El segundo de los riesgos, es la posibilidad de que se produzcan a partir de ellos malos olores en los alimentos que disminuyan su calidad (Tabla 6 de Introducción general), como es el 1,3-pentadieno, el objeto de estudio de esta Tesis.

Globalmente en ésta, hemos detectado una serie de factores que podrían influir en el crecimiento de levaduras en presencia de sorbatos y la producción de 1,3-pentadieno a partir de ellos, dificultando notablemente la predicción y el análisis de riesgo de deterioro por levaduras. Estos factores se podrían englobar en factores taxonómicos o dependientes de cepa, genéticos, ambientales y metabólicos.

De entre los factores ambientales, partiendo de que la mayoría de las cepas objeto de estudio de esta Tesis (Tablas 6, 7 y 8 del capítulo 2) se habían aislado de alimentos sólidos, hemos intentado estudiar en condiciones que no inhiban totalmente el crecimiento, cómo afecta la estructura al crecimiento de levaduras en presencia de sorbato potásico. La inexistencia de algún modelo cuantitativo clásico de crecimiento en medio sólido, nos ha llevado a la necesidad de utilizar metodologías sencillas de técnicas clásicas y desarrollar técnicas de análisis de imagen para evaluar cuantitativamente el crecimiento de poblaciones de levaduras sobre soportes sólidos. De esta forma hemos desarrollado un modelo que nos permite inicialmente identificar y cuantificar diferencias entre la cinética de crecimiento existentes en medio líquido y medio sólido.

Respecto al crecimiento de células viables, hemos comprobado que las colonias atraviesan tres etapas. La primera de ellas, una fase de crecimiento exponencial, con μ constantes y máximas, al igual que en medio líquido. La segunda, refleja el crecimiento restrictivo en medio sólido con μ decrecientes exponencialmente, en contraste con el cambio casi instantáneo que ocurre en cultivos líquidos y, que se culmina con una tercera fase pseudoestacionaria, ambas descritas por una cinética de tipo Gompertz. En esta tercera, las colonias siguen creciendo en tamaño pero con μ muy próximas a 0. Las consecuencias de estas diferencias son que las células planctónicas pasan más tiempo con un metabolismo exponencial (μ máximo y constante), mientras que las

células de las colonias son preestacionarias (μ decrecientes) o estacionarias (μ muy próximas a 0) durante la mayor parte de su vida. Respecto al tamaño colonial, su cinética de crecimiento se describe también mediante una ecuación de Gompertz, la cual supone una gran ventaja al poderse aplicar a todo el proceso de crecimiento del radio o del área de las colonias, en función de si son más o menos circulares. Además, también hemos comprobado que el área de las colonias es un buen parámetro indirecto para calcular el número de células que la forman. Este modelo se cumple en varias especies de levaduras pertenecientes a taxones muy distintos y con diferente metabolismo energético y también cuando las levaduras están creciendo en condiciones de estrés y con diferente capacidad de deterioro por la producción de 1,3-pentadieno.

En concreto, la aplicación del modelo al análisis del efecto inhibitor del sorbato sobre el crecimiento sobre superficies sólidas, uno de los objetivos principales de esta Tesis, ha mostrado cuantitativamente que afecta tanto a la cinética de crecimiento de células viables, con fases exponenciales más prolongadas y menores μ , como al crecimiento del área, ambas acompañadas o no según la especie, de cambios en la biomasa final de crecimiento y mostrando una fuerte dependencia del pH. Hemos encontrado que la inhibición del crecimiento por estos conservantes se debe también a los mecanismos básicos descritos en medios líquidos, es decir, a una disminución de la tasa específica de crecimiento y al rendimiento (Stratford y Anslow, 1996; Lambert y Stratford, 1999). También postulamos que además de la comparación de μ , en medio sólido habría que tener en cuenta ese rendimiento final de crecimiento pero en tiempos largos, a la hora de calcular la sensibilidad y tolerancia de una cepa, porque varias cepas son capaces de recuperarse tras el crecimiento exponencial y alcanzar al cabo de un tiempo altos crecimientos. Así podría equipararse el resultado a tiempos de vida útil más similares a los alimentos que contaminan. El parámetro Kw de las especies estudiadas comparados con los ya publicados para medio líquido para ácidos débiles (Quintas et al., 2005) nos muestra que durante el crecimiento inicial exponencial *S. cerevisiae* es igual de sensible en medio líquido y medio sólido, *Debaryomyces* más resistente en sólido y *Zygosaccharomyces* más sensible. Todo esto indica que la estructura del medio es uno de los factores ambientales que parece influir a la hora de crecer bajo conservantes, aunque más en unas especies que en otras y, consecuentemente en su capacidad de producir 1,3-pentadieno.

En *Z. rouxii*, al ser una levadura osmofílica (Martorell et al., 2007), probablemente la poca concentración de glucosa tanto en el medio líquido como el sólido empleado en este estudio sería otro factor ambiental adicional a la estructura que hace que crezca mal en ambos tipos de medios y más aún cuando adicionalmente se le suma el estrés producido por el conservante.

Otra de las condiciones ambientales que influyen tanto en el crecimiento de las levaduras en presencia de sorbato como en su capacidad de producir 1,3-pentadieno es el pH. pHs cercanos a la neutralidad, cuando el sorbato no tiene casi capacidad inhibitoria, parecen activar la producción de 1,3-pentadieno en *Debaryomyces*, llegando en algunos casos a descarboxilar más del 40 % del sorbato presente. Este mecanismo de bioconversión o detoxificación podría explicar la ligera resistencia de las cepas de *Debaryomyces* en medio sólido a pH 7 pero no a pH 5,6, porque a este pH la actividad descarboxilante disminuye o desaparece en las cepas en medio líquido (Tabla 5, capítulo 2). Probablemente, porque la acidificación del citoplasma comience a afectar a todos los sistemas enzimáticos a ese pH (Stopforth et al., 2005), incluido el encargado de producir 1,3-pentadieno, tanto en líquido como en sólido. La escasa inhibición del crecimiento por sorbato potásico que ocurre a pH 7 en medio sólido en las especies estudiadas y la observación de que la producción de 1,3-pentadieno es mucho más detectable a este pH en *Debaryomyces*, nos ha permitido identificar una cómoda condición ambiental de pH para las levaduras creciendo en presencia de sorbato y detectar así rápidamente de forma sensorial la actividad alterante por producción de 1,3-pentadieno. Esto refuerza el empleo de la detección sensorial de 1,3-pentadieno como prueba simplificada para discriminar microorganismos que lo produzcan.

La aparente estimulación de la producción de 1,3-pentadieno a pH neutro que ocurre en *D. hansenii* no se cumple en las especies de *S. cerevisiae* y *Z. rouxii* cuyos niveles de descarboxilación no superan el 2 %. Como en otros trabajos se obtuvo un porcentaje de descarboxilación similar, aunque a concentraciones y pHs diferentes (Casas et al., 1996; 1999; 2004; Stratford et al., 2007), nuestros resultados confirman que estas especies son independientes del pH para producirlo y podrían ser más dependientes de otros factores como la glucosa anteriormente mencionada para *Z. rouxii* o factores intrínsecos del alimento no identificados que no se han reproducido en los medios experimentales (Steels et al., 2000; Wilson et al., 2002). Un hecho llamativo es que, a diferencia de *D. hansenii* o *Z. rouxii* y a pesar de haber estudiado en esta Tesis varias cepas de *S. cerevisiae* productoras de 1,3-pentadieno *in vitro*, nunca hemos encontrado ni existen referencias bibliográficas de ningún alimento alterado por la producción de este metabolito por esta especie. Las causas podrían ser la estricta confidencialidad en referencia a los problemas de deterioro que ocurren en las industrias impidiendo saber realmente el alcance de este tipo de deterioro y las especies que lo generan y, por otro lado, que en esta especie influyan más las condiciones intrínsecas del alimento que en las otras especies, de forma que les sea mucho más fácil producirlos en los medios de laboratorio que en los alimentos.

Además de los factores ambientales y las condiciones metabólicas intracelulares discutidas en los anteriores párrafos, otros de los factores que influyen en la producción de 1,3-pentadieno reforzados por los resultados de esta Tesis son los factores genéticos. Simultáneamente al desarrollo de ésta, han ido apareciendo trabajos que describían los genes necesarios para el proceso metabólico de descarboxilación de los ácidos fenilacrílicos en *S. cerevisiae*, la misma que se utiliza para producir 1,3-pentadieno a partir de sorbato. Se centraban principalmente en el gen *PAD1* y a partir del año 2015 se publica la función del gen *FDC1*. El primero de ellos codifica una enzima que proporciona el poder reductor en forma de FMN reducido y prenilado necesario para que la descarboxilasa codificada por el segundo realice la descarboxilación no oxidativa del sorbato en 1,3-pentadieno (Lin et al., 2015; Payne et al., 2015; White et al., 2015), anteriormente atribuida única y erróneamente a la enzima Pad1. Esta vía tiene importancia industrial por tres motivos. El primero de ellos es que es la vía responsable de la producción de productos fenólicos volátiles mal olientes como el 4-vinilguaicol en bebidas originadas a partir de vegetales, fuente mayoritaria de estos ácidos fenilacrílicos (Goodey y Tubb, 1982; Clausen et al., 1994; Vanbeneden et al., 2008; Schwarz et al., 2012). El segundo de ellos, es que ambos genes forman parte de dos patentes publicadas en el año 2015 para sintetizar de forma renovable alquenos o estireno, monómeros en la síntesis de hidrocarburos, plásticos, adhesivos y resinas (Leys et al., 2015; Nielsen y Mckenna, 2015). El último y tercero de ellos, apoyado por nuestros resultados, es que se trata de la vía que produce 1,3-pentadieno en levaduras en general y no solo en *S. cerevisiae*. Tres datos apoyan esta afirmación: 1) las cepas productoras de 1,3-pentadieno analizadas *in silico*, tanto de *D. hansenii* como *Z. rouxii*, poseen secuencias homólogas de ambos genes; 2) las cepas no productoras de 1,3-pentadieno, al menos en *D. hansenii*, muestran deleciones de un único nucleótido en sus secuencias *FDC1* como ocurre en cepas de *S. cerevisiae* incapaces de producir 4-vinilguaicol a partir de ácido ferúlico; 3) las cepas de *D. hansenii* tienden a tener mutaciones y cambios de base en los mismos nucleótidos del gen *FDC1*, unos comunes en cepas no productoras y otros entre cepas no productoras de 1,3-pentadieno, como también ocurre en *S. cerevisiae* (Muckai et al. 2014; Chen et al., 2015). En *Z. rouxii* la ausencia de mutaciones significantes en sus secuencias tanto de cepas productoras como no productoras de 1,3-pentadieno en nuestras condiciones de ensayo nos hace pensar que, además de los factores genéticos que sintetizan el sistema de descarboxilación, el factor decisivo en su producción serían las condiciones ambientales como mecanismo regulatorio de este proceso, o una regulación enzimática y afinidad de las enzimas por el sustrato muy variable entre sus cepas.

Parece ser que esta vía preexistente en ellas para la descarboxilación de los ácidos fenilacrilícos de los vegetales, cuyos compuestos orgánicos malolientes generados en diversas bebidas ya eran conocidos hace cientos de años, ha sido aprovechada para la descarboxilación de un compuesto orgánico nuevo para levaduras y hongos a raíz de su empleo como conservante en alimentos a mediados del siglo pasado, el ácido sórbico y sus sales (Gooding, 1945; Stopforth et al., 2005). O que por otro lado, los microorganismos ya emplearan esta ruta de forma natural para avanzar en la colonización y utilización de los azúcares presentes en las bayas del arbusto serbal (*Sorbus aucuparia*) (Mikulic-Petkovsek et al., 2012) de donde se aisló por primera vez el ácido sórbico (Sofos, 1989) y que, la utilización de este sustrato por esta vía no se hubiera detectado en alimentos hasta el empleo de estos compuestos como conservantes. De una forma u otra, la revisión bibliográfica pone de manifiesto que el sistema de descarboxilación Pad/Fdc posee una gran cantidad de sustratos, con presumiblemente diferente afinidad para cada uno de ellos (Lin et al., 2015) y, como queda patente en esta Tesis, también pueden existir diferencias de afinidad entre especies, o incluso cepas, hacia el mismo sustrato.

Es obvio que la presencia de ambos genes *PAD1* y *FDC1* sin mutaciones que afecten a la actividad de la enzima es esencial para la producción de 1,3-pentadieno. Sin embargo, las mutaciones comunes en cepas que no producen este compuesto nos pueden ayudar a diseñar métodos que permiten identificar cepas peligrosas. En esta Tesis proponemos el empleo de estas secuencias para caracterizar cepas de *D. hansenii*, especialmente útil para detectar cepas de esta especie usadas como cultivos iniciadores en alimentos que utilizaran sorbato como conservante, ya que se podría eliminar el riesgo de producción de 1,3-pentadieno por esta especie. De igual modo, sondas similares serían útiles para asegurar que las cepas de *S. cerevisiae* empleadas en la fermentación de bebidas alcohólicas, sake o shochu, fueran incapaces de producir compuestos volátiles fenólicos malolientes. Aun así, como hemos indicado anteriormente, el riesgo de que el peligro se materialice no se puede asegurar del todo porque depende de factores ambientales, metabólicos y del alimento, siendo necesario avanzar más, precisamente, en las bases metabólicas que controlan la descarboxilación del sorbato y en la identificación de los agentes ambientales que influyen en las tasas de producción de estos compuestos malolientes.

Una vez comprobado que la diversidad de factores ambientales y metabólicos torna muy difícil la predicción y el control del deterioro por técnicas biológicas, otras técnicas son necesarias para si no prevenir, por lo menos detectar precozmente la producción de 1,3-pentadieno en alimentos. En la Tabla 1 del capítulo 2 se muestran todos los alimentos en los que se ha descrito en la bibliografía la aparición de este compuesto. Sólo en el estudio de Gürbüz en 2011, se midió directamente su concentración en los alimentos, concretamente en 21 productos de

supermercado que contenían sorbatos en su composición, como aceitunas negras, verdes en salmuera, miel, pan, galletas, salsa de soja, ensalada y queso y, las cantidades detectadas en todos ellos estuvieron entre 5 y 5000 mg/l.

Si bien, a bajas concentraciones de este compuesto no se han notificado efectos adversos en humanos ni en estudios con animales (CAS N° 504-60-9), la detección de su olor por parte de los consumidores en los alimentos que van a consumir les origina una sensación de poca seguridad y calidad del producto rechazando su consumo e iniciándose en muchos casos reclamaciones hacia la industria fabricante, que se traducen finalmente en pérdidas económicas para ella (Ridgway y Lalljie, 2011). Para evitar estos y posteriores episodios, muchas empresas optan por aumentar, dentro de los límites legales, la concentración de estos conservantes en sus productos, ya que no existen alternativas tecnológicas adecuadas y baratas que les ayuden a detectar y rechazar a tiempo los lotes con este problema. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para una correcta identificación y cuantificación del compuesto en alimentos, es una técnica que implica mucho tiempo, personal cualificado y es muy cara de aplicar en la industria (Ridgway et al., 2010). Por todo ello en esta Tesis también se inició un estudio para la detección de 1,3-pentadieno por métodos químicos más baratos y sencillos, que no detectan el agente productor si no el compuesto gaseoso del deterioro. Se ha iniciado la posible utilización de dispositivos MWIR junto a un análisis quimiométrico sencillo asociado para la detección de muestras con 1,3-pentadieno y otros productos gaseosos procedentes de la actividad microbiana en base a la absorción de sus enlaces característicos. Este dispositivo posee la ventaja de que puede detectar el agente deteriorante con independencia de que lo hayan producido bacterias, hongos o levaduras. Este abordaje es posible y recomendable industrialmente como una alternativa barata, no destructiva, automatizable y sin la necesidad de personal especialista para detectar muestras afectadas por este tipo de deterioro durante la línea de producción y/o distribución de los alimentos, además del CO₂ producido fermentativamente por algunas especies. El interés despertado en esta tecnología se ha visto ratificado en nuevos estudios para la detección de hidrocarburos y aceites alimentarios.

CONCLUSIONES

1. La cinética de crecimiento de colonias de levaduras sobre medio sólido atraviesa diferentes etapas. La primera, una fase exponencial con μ constante y máxima mientras la colonia no es casi visible y que se puede describir con el modelo exponencial de crecimiento, como ocurre en medio líquido. La segunda refleja el crecimiento restrictivo que hace que la μ comience a disminuir exponencialmente a lo largo del tiempo y, la tercera equivaldría a una fase pseudoestacionaria donde las colonias siguen creciendo en tamaño pero con μ próximas a 0. Estas dos últimas se pueden describir con una ecuación de tipo Gompertz adaptada para el número de células viables.
2. Las rutinas de análisis de imagen desarrolladas permiten una mayor velocidad, precisión, exactitud y capacidad de obtener parámetros de las mismas aunque no sean exactamente circulares o sus microcolonias no se hayan unificado. Esta herramienta ha permitido establecer que el crecimiento superficial de las colonias se puede describir con gran precisión utilizando una misma ecuación de Gompertz a lo largo del tiempo en términos de radio y área y que el área de las colonias a través del parámetro C_s (células totales/mm²) puede ser usada como parámetro indirecto del número de células totales que la forman.
3. Las herramientas y los modelos anteriores se aplican con buenos valores de ajuste al estudio del crecimiento de colonias de varias cepas y especies de levadura en presencia de sorbato potásico a diferentes pHs permitiendo comprobar que el efecto tóxico de los mismos también depende de las formas sin disociar y que la estructura del medio afecta más a unas especies que a otras. También nos ha permitido cuantificar sus efectos, similares a los descritos en medio líquido aunque con distinta intensidad: disminución de la tasa específica de crecimiento durante el crecimiento exponencial acompañada de disminución de la biomasa final.
4. Esta metodología ha permitido seguir el crecimiento colonial durante más de 500 h y ha permitido observar que aunque el sorbato potásico afecte a la cinética inicial de crecimiento de las células viables, esa inhibición puede ser superada en algunas especies alcanzándose recuentos finales de crecimiento tanto en A_{max} como Nv_{max} similares a los obtenidos en ausencia del conservante. Por lo que para analizar el comportamiento microbiano frente a un estrés y establecer términos de sensibilidad y tolerancia de una manera más adecuada a largos tiempos de vida útil de los alimentos, es necesario complementar el valor de μ con valores de biomasa final de crecimiento obtenidos en largos tiempos.

5. La detección sensorial a pH 7 y 0,75 g/l de sorbato potásico es una aproximación sencilla y rápida de detección de 1,3-pentadieno a partir de sorbatos y en esas condiciones, las cepas del género *Debaryomyces* son capaces de producir mucha más cantidad de este compuesto que *Z. rouxii* y *S. cerevisiae*.
6. Se han detectado secuencias homologas del gen *PAD1* de *S. cerevisiae*, tanto en *D. hansenii* como en *Z. rouxii*, aunque en esta última se había publicado lo contrario. Además, dado que ni el polimorfismo encontrado en las secuencias *DhPAD1* de *D. hansenii* afecta a residuos importantes para la funcionalidad de la proteína, ni hay una expresión diferencial del gen entre cepas productoras y no productoras de 1,3-pentadieno, nuestros resultados refuerzan los avances más recientes descritos en *S. cerevisiae* que rechazan la función descarboxilasa de la proteína Pad en el proceso de descarboxilación.
7. En comparación con los estudios realizados en *S. cerevisiae* donde la incapacidad de descarboxilación del sistema Pad1/Fdc1 es debido a mutaciones sin sentido o inserciones en la región *FDC1* sumado o no a mutaciones sin sentido en el gen *PAD1*, en las cepas de *D. hansenii* analizadas en este trabajo, la incapacidad de producir 1,3-pentadieno la marcan las deleciones en el gen *FDC1* que conducen a alteraciones de la región que codifica el dominio 2 del monómero de la proteína Fdc1, impidiendo la funcionalidad de la enzima. En cepas no productoras de 1,3-pentadieno de *Z. rouxii* no hemos encontrado mutaciones significativas en sus secuencias *ZrPAD1* y *ZrFDC1*, sugiriendo que la actividad de sus enzimas dependa más de otros factores ambientales o que necesite un mecanismo distinto.
8. Las mutaciones comunes detectadas en el gen *DhFDC1* de las cepas no productoras de 1,3-pentadieno de *D. hansenii* nos han permitido diseñar un protocolo de PCR que reconoce exclusivamente las cepas productoras de este compuesto.
9. La grabación en dinámico mediante un sistema MWIR no refrigerado de los espectros correspondientes a la liberación de los gases producidos por cultivos de levaduras junto con un análisis quimiométrico/multivariante asociado, permite diferenciar cultivos con gases procedentes del metabolismo microbiano, como 1,3-pentadieno y CO₂ (no siendo este último un objetivo inicial) debido a la absorción de sus enlaces a 3,15-3,30 μm el primero y a 4,10-4,30 μm el segundo.

10. El procedimiento más adecuado para diferenciar cultivos de levaduras muy productoras de CO₂ así como las capaces de producir 1,3-pentadieno sería la realización de un PCA de los espectros dinámicos, ajuste no lineal de los scores del PC2, PC3 y PC4, más un análisis de clúster empleando conjuntamente los valores de intensidad máxima, α , de todos los PCs. Para comprobar la correcta clasificación de los cultivos debido a la presencia o no de 1,3-pentadieno sin utilizar GC-MS, el procedimiento más adecuado implica la proyección del espectro medio de los últimos segundos de la señal dinámica en un espacio previamente definido mediante análisis discriminante con dos variables canónicas.

11. Se necesita de una validación externa del procedimiento con un mayor número de muestras y especies de levaduras, además del análisis de la influencia que ejercerían los envases alimentarios en la absorción del sistema. Así, el dispositivo MWIR podría ser utilizado como una alternativa barata, no destructiva, automatizable y que no requiere personal especialista, para la detección temprana de gases producidos por levaduras contaminantes durante la línea de producción y/o distribución de los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abellana, M., Benedí, J., Sanchís, V., Ramos, A. J. J. (1999). Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 371-380.

Aguilera, J. M. (2005). Why food microstructure?. *Journal of Food Engineering*, 67, 3-11.

Akiyama, M., Murakami, K., Ohtani, N., Iwatsuki, K., Sotoyama, K., Wada, A., Tokuno, K., Iwabuchi, H., Tanaka, K. (2003). Analysis of volatile compounds released during the grinding of roasted coffee beans using solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1961-1969.

Al-Holy, M. A., Lin, M., Alhaj, O. A., Abu-Goush, M. H. (2015). Discrimination between *Bacillus* and *Alicyclobacillus* isolates in apple juice by fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 80, 399-404.

Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Benn, D., Ruby, S. W., Veenhuis, M., Madeo, F., Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *The Journal of Cell Biology*, 174, 89-100.

Álvarez, M. A., Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, 39, 146-155.

Ammor, M. S., Argyri, A., Nychas, G. J. E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81, 507-514.

Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. (2006). The Swiss-Model workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201.

Andrade, M. J., Córdoba, J. J., Casado, E. M., Córdoba, M. G., Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage "salchichón". *Meat Science*, 85, 256-264.

Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Durán-Quintana, M. C., Garrido-Fernández, A. (2008). Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives. *Food Microbiology*, 25, 566-574.

Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A., Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 120-127.

Aspridou, Z., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., Koutsoumanis, K. P. (2014). Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Research International*, 64, 683-691.

Azhu Valappil, Z., Fan, X., Zhang, H. Q. Rouseff, R. L. (2009). Impact of thermal and nonthermal processing technologies on unfermented apple cider aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 924-929.

B

Baranowski, J. D., Davidson, P. M., Nagel, C. W., Branen, A. L. (1980). Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. *Journal of Food Science*, 45, 592-594.

- Baranyi, J., Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Baranyi, J., Tamplin, M. L. (2004). ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection*, 67, 1967-1971.
- Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D. (2000). *Yeasts: characteristics and identification*, 3 Ed. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Barreiro, P., Zheng, C., Sun, D. W., Hernández-Sánchez, N., Pérez-Sánchez, J. M., Ruiz-Cabello, J. (2008). Non-destructive seed detection in mandarins: comparison of automatic threshold methods in FLASH and COMSPIRA MRIs. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 189-198.
- Bastos, A. C., Magan, N. (2006). Potential of an electronic nose for the early detection and differentiation between *Streptomyces* in potable water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116, 151-155.
- Benedetti, S., Iametti, S., Bonomi, F., Mannino, S. (2005). Head space sensor array for the detection of aflatoxin M1 in raw ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 68, 1089-1092.
- Benedito, J., Cambero, M. I., Ortuno, C., Cabeza, M. C., Ordonez, J. A., De la Hoz, L. (2011). Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 505-513.
- Berna, A. Z., Trowell, S., Cynkar, W., Cozzolino, D. (2008). Comparison of metal oxide-based electronic nose and mass spectrometry-based electronic nose for the prediction of red wine spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3238-3244.
- Beveridge, R., Migas, L. G., Payne, K. A., Scrutton, N. S., Leys, D., Barran, P. E. (2016). Mass spectrometry locates local and allosteric conformational changes that occur on cofactor binding. *Nature Communications*, 7, 12163. doi: 10.1038/ncomms12163.
- Bhardwaja, S. K., Dwivedia, K., Agarwala, D. D. (2016). A review: GC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 6, 1-7.
- Bhuiya, M. W., Lee, S. G., Jez, J. M., Yu, O. (2015). Structure and mechanism of ferulic acid decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4216-4223.
- Bills, S., Restaino, L., Lenovich, L. M. (1982). Growth response of an osmotolerant sorbate-resistant yeast, *Saccharomyces rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. *Journal of Food Protection*, 45, 1120-1124.
- Binder, B. J., Sundstrom, J. F., Gardner, J. M., Jiranek, V., Oliver, S. G. (2015). Quantifying two-dimensional filamentous and invasive growth spatial patterns in yeast colonies. *PLoS Computational Biology*, 11, e1004070. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004070.
- Birou, B., Marison, I. W., Stockar, U. V. (1987). Calorimetric investigation of aerobic fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 650-660.
- Boons, K., Mertens, L., Van Derlinden, E., David, C. C., Hofkens, J., Van Impe, J. F. (2013). Behavior of *Escherichia coli* in a heterogeneous gelatin-dextran mixture. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3126-3128.
- Bosch-Fusté, J., Riu-Aumatell, M., Guadayol, J. M., Caixach, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S. (2007). Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*, 105, 428-435.
- Bradley, J. V. (1968). *Distribution-free statistical tests*. Prentice-Hall, Nueva Jersey, Estados Unidos.

Braun, P. G., Sutherland, J. P. (2006). Modelling microbial food spoilage. En: Blackburn, C. D. W. (Ed.). Food spoilage microorganisms. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Reino Unido. 86-118.

Brocklehurst, T. F., Parker, M. L., Gunning, P. A., Coleman, H. P., Robins, M. M. (1995a). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 609-615.

Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., Ridge, Y. P., Seale, R., Smith, A. C. (1995b). The effect of transient temperatures on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2 in gelatin gel. *International Journal of Food Microbiology*, 27, 45-60.

Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., Smith, A. C. (1997). A model experimental gel-surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology*, 14, 303-311.

Brocklehurst, T. (2004). Challenge of food and the environment. En: McKellar, R. C., Lu, X. (Eds.). Modeling microbial responses in food. CRC Press, Florida, Estados Unidos. 197-232.

Brogna, S., Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 107-113.

Brown, D., Rothery, P. (1994). Deterministic models of growth and decline. En: Brown, D., Rothery, P. (Eds.). Models in biology: mathematics, statistics and computing. John Wiley and Sons, Cambridge, Reino Unido. 13-60.

Buchanan, R. L., Whiting, R. C., Damert, W. C. (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14, 313-326.

Burlini, N., Pellegrini, R., Facheris, P., Tortora, P., Guerritore, A. (1993). Metabolic effects of benzoate and sorbate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at neutral pH. *Archives of Microbiology*, 159, 220-224.

C

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T. L. (2008). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z. (2009). Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 32572-32581.

Carmona-Gutiérrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. (2010). Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death and Differentiation*, 17, 763-773.

Casado, F. J., Sánchez, A. H., Rejano, L., de Castro, A., Montañó, A. (2010). Stability of sorbic and ascorbic acids in packed green table olives during long-term storage as affected by different packing conditions, and its influence on quality parameters. *Food Chemistry*, 122, 812-818.

Casas, E., Garrido, M. P., Quintana, M. A. (1996). Spoilage of marzipan products by an osmotolerant yeast. *Advances in Food Sciences*, 18, 56-60.

Casas, E., Valderrama, M. J., Peinado, J. M. (1999). Sorbate detoxification by spoilage yeasts isolated from marzipan products. *Food Technology and Biotechnology*, 37, 87-92.

Casas, E. (1999). Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos altamente azucarados. Tesis doctoral. *Universidad Complutense de Madrid*.

- Casas, E., De Ancos, B., Valderrama, M. J., Cano, P., Peinado, J. M. (2004). Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 93-96.
- Cetin, A. E., Akers, D. L. (2011). Method, device and system for determining the presence of volatile organic and hazardous vapors using an infrared light source and infrared video imaging. *U.S. Patent No. US20130050466 A1*.
- Chapuis, C., Rosso, L., Flandrois, J. P. (1995). Relationship between colonial surface and density on agar plate. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 542-550.
- Char, C. D., Guerrero, S. N., Alzamora, S. M. (2007). Growth of *Eurotium chevalieri* in milk jam: influence of pH, potassium sorbate and water activity. *Journal of Food Safety*, 27, 1-16.
- Chen, Q., Zhang, C., Zhao, J., Ouyang, Q. (2013). Recent advances in emerging imaging techniques for non-destructive detection of food quality and safety. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, 261-274.
- Chen, P., Dong, J., Yin, H., Bao, X., Chen, L., He, Y., Wan, X., Chen, R., Zhao, Y., Hou, X. (2015). Single nucleotide polymorphisms and transcription analysis of genes involved in ferulic acid decarboxylation among different beer yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 121, 481-489.
- Cheng, L., Piper, P. W. (1994). Weak acid preservatives block the heat shock response and heat-shock-element-directed *lacZ* expression of low pH *Saccharomyces cerevisiae* cultures, an inhibitory action partially relieved by respiratory deficiency. *Microbiology*, 140, 1085-1096.
- Chisholm, M. G., Samuels, J. M. (1992). Determination of the impact of the metabolites of sorbic acid on the odor of a spoiled red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 630-633.
- Chou, J. (2000). Infrared gas sensors. En: Chou, J. (Ed.). *Hazardous gas monitors: a practical guide to selection, operation and applications*. McGraw-Hill Professional Publishing, Nueva York, Estados Unidos, 55-72.
- Church, I. J., Parsons, A. L. (1995). Modified atmosphere packaging technology: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 143-152.
- Clausen, M., Lamb, C. J., Megnet, R., Doerner, P. W. (1994). *PAD1* encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 142, 107-112.
- Comisión Europea (2011). Reglamento (CE) N° 1129/2011 del 11 de Noviembre del 2011 que modifica el Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que establece una lista de los aditivos alimentarios permitidos. *Official Journal of the European Union* L 295, Bruselas, Bélgica.
- Concina, I., Bornšek, M., Baccelliere, S., Falasconi, M., Gobbi, E., Sberveglieri, G. (2010). *Alicyclobacillus* spp.: detection in soft drinks by electronic nose. *Food Research International*, 43, 2108-2114.
- Cooper, A. L., Dean, A. C. R., Hinshelwood, C. (1968). Factors affecting the growth of bacterial colonies on agar plates. *Proceedings of the Royal Society*, 171, 175-199.
- Corkidi, G., Diaz-Urbe, R., Folch-Mallol, J. L., Nieto-Sotelo, J. (1998). COVASIAM: an image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1400-1404.
- Correa Hernando, E. C., Barreiro, P., Ruíz-Altisent, M., Miro, R., Echeverría, G., Graell, J., Lopez, M. L. (2002). Use of a QCM electronic nose to evaluate the aromatic quality in apples. En: 6th International symposium on fruit, nut and vegetable production engineering. 551-536. ISBN 3-00-008305-7.

Correa Hernando, E. C., Barreiro Elorza, P., Ruíz-Altisent, M., Fructuoso, L., Luisa, M., Graell, J., Echeverría, G. (2004). Aplicación de una nariz electrónica para la medida de aromas emitidos por manzanas cv. Fuji conservadas con diferentes tecnologías. *Fruticultura Profesional*, 29, 5-12.

Correa Hernando, E. C., Barreiro Elorza, P., Ruíz-Altisent, M. (2005). Las narices electrónicas en el ámbito de la industria agroalimentaria. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 24, 90-98.

Crowell, E. A., Guymon, J. F. (1975). Wine constituents arising from sorbic acid addition, and identification of 2-ethoxyhexa-3, 5-diene as source of geranium-like off-odor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26, 97-102

D

Dalgaard, P., Buch, P., Silberg, S. (2002). Seafood spoilage predictor—development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 343-349.

Dang, Y., Liu, Z., Gao, X., Gao, X., Cao, J., Bao, G. (2016). Determination of Volatiles in ham by gas chromatography with olfactory detection. *International Journal of Food Engineering*, 12, 323-332.

Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., Magan, N. (2007). Mould germination: data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 17-24.

Davenport, R. R. (1980). Cold-tolerant yeasts and yeast-like organisms. En: Skinner, F. A., Passmore, S. M., Davenport, R. R. (Eds.). *Biology and activities of yeasts*. Academic Press, Londres, Reino Unido. 215-230.

Davenport, R. R. (1996). Forensic microbiology for soft drinks business. *Soft Drinks Management International*, 1996, 34-35.

Davenport, R. R. (1997). Forensic microbiology II. Case book investigations. *Soft Drinks Management International*, 1997, 26-30.

Davenport, R. R. (1998). Microbiology of soft drinks. En: Ashurst, P. R. (Ed.). *The chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Sheffield Academic Press, Sheffield, Reino Unido. 197-216.

Davis, M. W. (2008). Ape: A plasmid editor. <http://www.biology.Ttah.edT/jorgensen/wayned/ape/e>.

Deák, T., Novak, E. K. (1972). Assimilation of sorbic acid by yeast. *Acta Alimentaria*, 1, 87-104.

Deák, T., Beuchat, L. R. (1996). *Handbook of food spoilage yeasts*. CRC Press, Florida, Estados Unidos.

Deák, T. (2008). *Handbook of food spoilage yeasts*, 2 Ed. CRC Press, Florida, Estados Unidos.

Deisingh, A. K., Stone, D. C., Thompson, M. (2004). Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 587-604.

De Lacy Costello, B., Amann, A., Al-Kateb, H., Flynn, C., Filipiak, W., Khalid, T., Osborne, D., Ratcliffe, N. M. (2014). A review of the volatiles from the healthy human body. *Journal of Breath Research*, 8, 014001. doi: 10.1088/1752-7155/8/1/014001.

De Nobel, J. G., Barnett, J. A. (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast*, 7, 313-323.

De Nobel, H., Lawrie, L., Brul, S., Klis, F., Davis, M., Alloush, H., Coote, P. (2001). Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18, 1413-1428.

Dens, E. J., Van Impe, J. F. (2001). On the need for another type of predictive model in structured foods. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 247-260.

De Rosa, T., Margheri, G., Moret, I., Scarponi, G., Versini, G. (1983). Sorbic acid as a preservative in sparkling wine. Its efficacy and adverse flavor effect associated with ethyl sorbate formation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 34, 98-102.

Dickinson, J. R., Kruckerberg, A. L. (2006). Carbohydrate Metabolism. En: Querol, A., Fleet, G. (Eds.). *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlín, Alemania. 215-242.

Diezma-Iglesias, B., Barreiro, P., Blanco, R., García-Ramos, F. J. (2008). Comparison of robust modeling techniques on NIR spectra used to estimate grape quality. *Acta Horticulturae*, 802, 367-372.

Ding, T., Shim, Y. H., Choi, N. J., Ha, S. D., Chung, M. S., Hwang, I. G., Oh, D. H. (2010). Mathematical modeling on the growth of *Staphylococcus aureus* in sandwich. *Food Science and Biotechnology*, 19, 763-768.

Dong, D., Zheng, W., Jiao, L., Lang, Y., Zhao, X. (2016). Chinese vinegar classification via volatiles using long-optical-path infrared spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 194, 95-100.

Dykes, G. A. (1999). Image analysis of colony size for investigating sublethal injury in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 7, 223-231.

E

Eaton, K. K. (2002). Moulds, yeasts, ascospores, basidiospores, algae and lichens: toxic and allergic reactions. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 12, 321-335.

Edinger, W. D., Splittstoesser, D. F. (1986). Production by lactic acid bacteria of sorbic alcohol, the precursor of the geranium odor compound. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 34-38.

EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), (2015). Scientific opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal* 2015, 13, 4144. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4144.

Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 383-389.

El Halouat, A., Debevere, J. M. (1996). Influence of modified atmosphere and preservatives on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from dried fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 219-229.

Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., Goodacre, R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2822-2828.

Ellis, D. I., Brewster, V. L., Dunn, W. B., Allwood, J. W., Golovanov, A. P., Goodacre, R. (2012). Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews*, 41, 5706-5727.

Elmore, J. S. (2015). Aroma extract analysis. En: Parker, J. K., Elmore, S., Methven, L. (Eds.). *Flavour development, analysis and perception in food and beverages*. Elsevier Ltd., Cambridge, Reino Unido. 47-61.

F

Fahrenfort, J. (1961). Attenuated total reflection: a new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. *Spectrochimica Acta*, 17, 698-709.

- Fakruddin, M., Mazumdar, R., Mannan, K. (2012). Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 40, 121-131.
- Fang, Y., Qian, M. C. (2005). Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *Journal of Chromatography A*, 1080, 177-185.
- Fazzalari, F. A. (1978). Compilation of odor and taste threshold values data. ASTM data series, Filadelfia, Estados Unidos.
- Fecko, C. J., Eaves, J. D., Loparo, J. J., Tokmakoff, A., Geissler, P. L. (2003). Ultrafast hydrogen-bond dynamics in the infrared spectroscopy of water. *Science*, 301, 1698-1702.
- Ferguson, K. L., Arunrattanamook, N., Marsh, E. N. G. (2016). Mechanism of the novel prenylated flavin-containing enzyme ferulic acid decarboxylase probed by isotope effects and linear free-energy relationships. *Biochemistry*, 55, 2857-2863.
- Ferreira, M. M., Loureiro-Dias, M. C., Loureiro, V. (1997). Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 145-153.
- Ferrer, J., Prats, C., López, D., Vives-Rego, J. (2009). Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: a SWOT analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 2-8.
- Finol, M. L., Marth, E. H., Lindsay, R. C. (1982). Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. *Journal of Food Protection*, 45, 398-404.
- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 68, 199-211.
- Fleet, G. (1992). Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 1-44.
- Fleet, G. H. (2006). The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production. En: Querol, A., Fleet, G. (Eds.). *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlín, Alemania. 335-379.
- Fleet, G. H., Balia, R. (2006). The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. En: Querol, A. Fleet, G. (Eds.). *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlín, Alemania. 381-398.
- Fleet, G. H. (2011). Yeast spoilage of foods and beverages. En: Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T. (Eds.). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Ltd., Londres. Reino Unido. 53-63.
- Floury, J., Jeanson, S., Madec, M. N., Lortal, S. (2013). Porosity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LD61 colonies immobilised in model cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 64-70.
- Foster, A. M., Ketteringham, L. P., Purnell, G. L., Kondjoyan, A., Havet, M., Evans, J. A. (2006). New apparatus to provide repeatable surface temperature-time treatments on inoculated food samples. *Journal of Food Engineering*, 76, 19-26.
- Fragoso, A. (2014). Efecto del sorbato potásico sobre el crecimiento de levaduras en medio sólido. Trabajo Fin de Grado, Grado en Bioquímica. *Universidad Complutense de Madrid*.
- Fraleigh, S. P., Bungay, H. R. (1986). Modelling of nutrient gradients in a bacterial colony. *Microbiology*, 132, 2057-2060.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., Debevere, J. (2003). Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 26-30.

Freese, E., Levin, B. C. (1978). Action mechanisms of preservatives and antiseptics. *Developments in Industrial Microbiology*, 19, 207-227.

Fudge, A. L., Wilkinson, K. L., Ristic, R., Cozzolino, D. (2011). Classification of smoke tainted wines using mid-infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 52-59.

Fuge, E. K., Werner-Washburne, M. (1997). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En: Hohmann, S., Mager, W. H. (Eds.). Yeast stress responses. Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Company, Texas, Estados Unidos. 53-74.

Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi, S. (2004). A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiology*, 21, 501-509.

Fujikawa, H., Morozumi, S. (2005). Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7920-7926.

Fujikawa, H., Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23, 260-267.

Fujikawa, H. (2010). Development of a new logistic model for microbial growth in foods. *Biocontrol Science*, 15, 75-80.

G

Gagnon, M. A., Tremblay, P., Savary, S., Duval, M., Farley, V., Guyot, É., Chamberland, M. (2014). Airborne midwave and longwave Infrared hyperspectral imaging of gases. En: SPIE 9106. Advanced environmental, chemical, and biological sensing technologies XI, 91060C. doi: 10.1117/12.2050588.

García, D., Ramos, A. J., Sanchís, V., Marín, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiology*, 26, 757-769.

García, D., Ramos, A. J., Sanchís, V., Marín, S. (2010). Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. *Food Microbiology*, 27, 909-917.

García-González, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J. F., Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.

Gardner, L. K., Lawrence, G. D. (1993). Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 693-695.

Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., Van Impe, J. F. (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 229-244.

Gente, S., Larpin, S., Cholet, O., Guéguen, M., Vernoux, J. P., Desmasures, N. (2007). Development of primers for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. *Journal of Dairy Research*, 74, 137-145.

Ghosh, P. K., Jayas, D. S. (2009). Use of spectroscopic data for automation in food processing industry. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3, 3-11.

Gil de Prado, E., Rivas, E. M., Silóniz, M. I., Diezma, B., Barreiro, P., Peinado, J. M. (2014). Quantitative analysis of morphological changes in yeast colonies growing on solid medium: the eccentricity and Fourier indices. *Yeast*, 31, 431-440.

- Ginesu, G., Giusto, D. D., Märgner, V., Meinschmidt, P. (2004). Detection of foreign bodies in food by thermal image processing. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, 51, 480-490.
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 503-512.
- Gómez, A. H., He, Y., Pereira, A. G. (2006). Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *Journal of Food Engineering*, 77, 313-319.
- Gómez-Aguado, F., Alou, L., Corcuera, M. T., Sevillano, D., Alonso, M. J., Gómez-Lus, M. L., Prieto, J. (2011). Evolving architectural patterns in microbial colonies development. *Microscopy Research and Technique*, 74, 925-930.
- Gómez-Carracedo, M. P., Andrade, J. M., Calvino, M., Fernández, E., Prada, D., Muniategui, S. (2003). Multivariate prediction of eight kerosene properties employing vapour-phase mid-infrared spectrometry. *Fuel*, 82, 1211-1218.
- González, D. J., Xu, Y., Yang, Y. L., Esquenazi, E., Liu, W. T., Edlund, A., Duong, T., Du, L., Molnár, I., Gerwick, W. H., Jensen, P. R., Fischbach, M., Liaw, C.-C., Straight, P., Nizet, V., Dorrestein, P. C. (2012). Observing the invisible through imaging mass spectrometry, a window into the metabolic exchange patterns of microbes. *Journal of Proteomics*, 75, 5069-5076.
- González, R., Quirós, M., Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science and Technology*, 29, 55-61.
- González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., González-Pérez, C., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., Ortega, I. L. (2014). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of volatile components in cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 666-673.
- Gonzalvez, A., Garrigues, S., de la Guardia, M., Armenta, S. (2011). The ways to the trace level analysis in infrared spectroscopy. *Analytical Methods*, 3, 43-52.
- Goodey, A. R., Tubb, R. S. (1982). Genetic and biochemical analysis of the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to decarboxylate cinnamic acids. *Journal of General Microbiology*, 128, 2615-2620.
- Gooding, C. M. (1945). Process of inhibiting growth of molds. *U.S. Patent No.* US2379294 A.
- Gospavic, R., Kreyenschmidt, J., Bruckner, S., Popov, V., Haque, N. (2008). Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 290-297.
- Gowen, A. A., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., McDonnell, K., O'Donnell, C. P. (2010). Applications of thermal imaging in food quality and safety assessment. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 190-200.
- Granek, J. A., Magwene, P. M. (2010). Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genetics*, 6, e1000823. doi: org/10.1371/journal.pgen.1000823.
- Gray, B. F., Kirwan, N. A. (1974). Growth rates of yeast colonies on solid media. *Biophysical Chemistry*, 1, 204-213.
- Grimson, M. J., Barker, G. C. (1993). A continuum model for the growth of bacterial colonies on a surface. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, 26, 5645-5654.

Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W., Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40, 187-206.

Gu, W., Li, X., Huang, J., Duan, Y., Meng, Z., Zhang, K. Q., Yang, J. (2011). Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter sp. Px6-4* gene for ferulic acid decarboxylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1797-1805.

Guerreiro, J. F., Mira, N. P., Sá-Correia, I. (2012). Adaptive response to acetic acid in the highly resistant yeast species *Zygosaccharomyces bailii* revealed by quantitative proteomics. *Proteomics*, 12, 2303-2318.

Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., Marchetti, R. (1993). Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 329-341.

Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J. C. (2006). Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells. *Journal of Microbiological Methods*, 65, 324-334.

Gulmezian, M., Hyman, K. R., Marbois, B. N., Clarke, C. F., Javor, G. T. (2007). The role of UbiX in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467, 144-153.

Gürbüz, O. (2011). Determination of trans-1,3-pentadiene in foods due to the presence of sorbic acid using SPME-GC-MS. *Instrumentation Science and Technology*, 39, 432-446.

H

Haddi, Z., Alami, H., El Bari, N., Tounsi, M., Barhoumi, H., Maaref, A., Jaffrezic-Renault, N., Bouchikhi, B. (2013). Electronic nose and tongue combination for improved classification of Moroccan virgin olive oil profiles. *Food Research International*, 54, 1488-1498.

Hampton, C. V., Pierson, W. R., Harvey, T. M., Updegrave, W. S., Marano, R. S. (1982). Hydrocarbon gases emitted from vehicles on the road. 1. A qualitative gas chromatography/mass spectrometry survey. *Environmental Science and Technology*, 16, 287-298.

Harcombe, W. R., Riehl, W. J., Dukovski, I., Granger, B. R., Betts, A., Lang, A. H., Bonilla, G., Kar, A., Leiby, N., Mehta, P., Marx, C. J., Segrè, D. (2014). Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics. *Cell Reports*, 7, 1104-1115.

Harrison, W. A., Peters, A. C., Fielding, L. M. (2000). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4 and 8°C using a model food system. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 38-43.

Heberle, I., Liebming, A., Weimar, U., Göpel, W. (2000). Optimised sensor arrays with chromatographic prepreparation: characterisation of alcoholic beverages. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 68, 53-57.

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, K. U., Wissing, S., Büttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 164, 501-507.

Hills, B. P., Wright, K. M. (1994). A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *Journal of Theoretical Biology*, 168, 31-41.

Hochberg, M. S., Folkman, J. (1972). Mechanism of size limitation of bacterial colonies. *Journal of Infectious Diseases*, 126, 629-635.

Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J., Coote, P. J. (1996). Activity of the plasma membrane H (+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3158-3164.

Holyoak, C. D., Bracey, D., Piper, P. W., Kuchler, K., Coote, P. J. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *Journal of Bacteriology*, 181, 4644-4652.

Horwood, J. F., Lloyd, G. T., Ramshaw, E. H., Stark, W. (1981). An off-flavour associated with the use of sorbic acid during feta cheese maturation. *Australian Journal of Dairy Technology*, 36, 38-40.

Howell, K. (2016). Spoilage: yeast spoilage of food and beverages. En: Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F. (Eds.). *Encyclopedia of food and health*. Academic Press, Oxford, Reino Unido. 113-117.

Huang, H., Yu, H., Xu, H., Ying, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review. *Journal of Food Engineering*, 87, 303-313.

Huang, L. (2010). Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 in mechanically-tenderized beef. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 40-48.

Huang, X. C., Yuan, Y. H., Wang, X. Y., Jiang, F. H., Yue, T. L. (2015a). Application of electronic nose in tandem with chemometric analysis for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris*-spawned spoilage in apple juice beverage. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1295-1304.

Huang, X. C., Guo, C. F., Yuan, Y. H., Luo, X. X., Yue, T. L. (2015b). Detection of medicinal off-flavor in apple juice with artificial sensing system and comparison with test panel evaluation and GC-MS. *Food Control*, 51, 270-277.

Huck, P. M., Kenefick, S. L., Hrudehy, S. E., Zhang, S. (1995). Bench-scale determination of the removal of odour compounds with biological treatment. *Water Science Technology*, 31, 203-209.

J

Jandric, Z., Gregori, C., Klopff, E., Radolf, M., Schüller, C. (2013). Sorbic acid stress activates the *Candida glabrata* high osmolarity glycerol MAP kinase pathway. *Frontiers in Microbiology*, 4, 350. doi: 10.3389/fmicb.2013.00350.

Jeanson, S., Chadoeuf, J., Madec, M. N., Aly, S., Flourey, J., Brocklehurst, T. F., Lortal, S. (2011). Spatial distribution of bacterial colonies in a model cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1493-1500.

Jeanson, S., Flourey, J., Gagnaire, V., Lortal, S., Thierry, A. (2015). Bacterial colonies in solid media and foods: a review on their growth and interactions with the micro-environment. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1284. doi: 10.3389/fmicb.2015.01284.

Jin, W. Q., Li, J. K., Dun, X., Jin, M., Wang, X. (2014). Wide-band gas leak imaging detection system using UFPA. En: SPIE 9301. International symposium on optoelectronic technology and application 2014: image processing and pattern recognition, 930102. doi: 10.1117/12.2070654.

Joly, L., Parvite, B., Zeninari, V., Durry, G. (2007). Development of a compact CO₂ sensor open to the atmosphere and based on near-infrared laser technology at 2,68 µm. *Applied Physics B*, 86, 743-748.

Jones, R. P., Greenfield, P. F. (1987). Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast*, 3, 223-232.

Judet, D., Bensoussan, M., Perrier-Cornet, J. M., Dantigny, P. (2008). Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity. *Food Microbiology*, 25, 902-907.

Juneja, V. K., Melendres, M. V., Huang, L., Subbiah, J., Thippareddi, H. (2009). Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 106-111.

Jung, D. H., Choi, W., Choi, K. Y., Jung, E., Yun, H., Kazlauskas, R. J., Kim, B. G. (2013). Bioconversion of p-coumaric acid to p-hydroxystyrene using phenolic acid decarboxylase from *B. amyloliquefaciens* in biphasic reaction system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1501-1511.

K

Kabanova, N., Stulova, I., Vilu, R. (2012). Microcalorimetric study of the growth of bacterial colonies of *Lactococcus lactis* IL1403 in agar gels. *Food Microbiology*, 29, 67-79.

Kabanova, N., Stulova, I., Vilu, R. (2013). Microcalorimetric study of growth of *Lactococcus lactis* IL1403 at low glucose concentration in liquids and solid agar gels. *Thermochimica Acta*, 559, 69-75.

Kabisch, J., Erl-Höning, C., Wenning, M., Böhnlein, C., Gareis, M., Pichner, R. (2016). Spoilage of vacuum-packed beef by the yeast *Kazachstania psychrophila*. *Food Microbiology*, 53, 15-23.

Kachko, A., van der Ham, L. V., Bardow, A., Vlugt, T. J., Goetheer, E. L. (2016). Comparison of Raman, NIR, and ATR FTIR spectroscopy as analytical tools for in-line monitoring of CO₂ concentration in an amine gas treating process. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 47, 17-24.

Kamath, R. S., Bungay, H. R. (1988). Growth of yeast colonies on solid media. *Microbiology*, 134, 3061-3069.

Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, É., Pillonel, L., Picque, D., Bosset, J. O., De Baerdemaeker, J. (2006). Mid-infrared spectrometry: a tool for the determination of chemical parameters in Emmental cheeses produced during winter. *Le Lait*, 86, 83-97.

Karoui, R., Downey, G., Blecker, C. (2010). Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure –quality relationships– a review. *Chemical Reviews*, 110, 6144-6168.

Katsaras, K., Leistner, L. (1991). Distribution and development of bacterial colonies in fermented sausages. *Biofouling*, 5, 1124-1145.

Kelly, J. D., Downey, G., Fouratier, V. (2004). Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 33-39.

Khanmohammadi, M., Karami, F., Mir-Marqués, A., Garmarudi, A. B., Garrigues, S., de la Guardia, M. (2014). Classification of persimmon fruit origin by near infrared spectrometry and least squares-support vector machines. *Journal of Food Engineering*, 142, 17-22.

Kilcast, D., Subramaniam, P. (2000). The stability and shelf-life of food. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Reino Unido.

Kilcast, D. (2003). Sensory analytical methods in detecting taints and off-flavours in food. En: Baigrie, B. (Ed.). Taints and off-flavours in foods. CRC Press, Cambridge, Reino Unido. 5-30.

Kim, J. W., Kim, Y. S., Kyung, K. H. (2004). Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *Journal of Food Protection*, 67, 499-504.

- Kim, S. S., Young, C., Vidakovic, B., Gabram-Mendola, S. G., Bayer, C. W., Mizaikoff, B. (2010). Potential and challenges for mid-infrared sensors in breath diagnostics. *Sensors Journal, IEEE*, 10, 145-158.
- Kinderlerer, J. L., Hatton, P. V. (1990). Fungal metabolites of sorbic acid. *Food Additives and Contaminants*, 7, 657-669.
- Koch, A. L. (1975). The kinetics of mycelial growth. *Microbiology*, 89, 209-216.
- Komoto, A., Hanaki, K. I., Maenosono, S., Wakano, J. Y., Yamaguchi, Y., Yamamoto, K. (2003). Growth dynamics of *Bacillus circulans* colony. *Journal of Theoretical Biology*, 225, 91-97.
- Kourist, R., Guterl, J. K., Miyamoto, K., Sieber, V. (2014). Enzymatic decarboxylation—an emerging reaction for chemicals production from renewable resources. *ChemCatChem*, 6, 689-701.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., Sofos, J. N. (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 21, 415-422.
- Koutsoumanis, K. P., Lianou, A. (2013). Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2294-2301.
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubs, M., Sols, A., Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemistry Journal*, 214, 657-663.
- Kren, A., Mamnun, Y. M., Bauer, B. E., Schüller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Gregori, C., Piper, P., Kuchler, K. (2003). War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 1775-1785.
- Krulikovská, T., Jarošová, E., Patáková, P. (2011). Evaluation of *Rhodotorula* growth on solid substrate via a linear mixed effects model. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 400-410.
- Kurogochi, S., Tahara, S., Mizutani, J. (1974). Fungal metabolites of sorbic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 893-895.
- Kurogochi, S., Tahara, S., Mizutani, J. (1975). Fungal reduction of C6 α , β -unsaturated carboxylic acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 825-831.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeast. En: Kurtzman, C., Fell, J. W., Boekhout, T. (Eds.). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Ltd., Londres, Reino Unido. 1-8.
- L**
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P. (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9193-9200.
- Lambert, R. J., Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 157-164.
- Lan, C. L., Chen, S. L. (2016). The decarboxylation of α , β -unsaturated acid catalyzed by prenylated FMN-dependent ferulic acid decarboxylase and the enzyme inhibition. *The Journal of Organic Chemistry*, 81, 9289-9295.
- Lawless, C., Wilkinson, D. J., Young, A., Addinall, S. G., Lydall, D. A. (2010). Colonyzer: automated quantification of micro-organism growth characteristics on solid agar. *BMC Bioinformatics*, 11, 287-298.

- Lebel, K., MacPherson, S., Turcotte, B. (2006). New tools for phenotypic analysis in *Candida albicans*: the *WAR1* gene confers resistance to sorbate. *Yeast*, 23, 249-259.
- Lee, Y. J., Jung, B. S., Yoon, H. J., Kim, K. T., Paik, H. D., Lee, J. Y. (2014). Predictive model for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in raw pork meat as a function of temperature. *Food Control*, 44, 16-21.
- Le Marc, Y., Valík, L., Medved'ová, A. (2009). Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 306-311.
- Leys, D., Payne, K. A. P., Scrutton, N. S., Parker, D. A., Murphy, A. J. (2015). Methods for preparing a hydrocarbon. *U.S. Patent No. US9157099 B2*.
- Leyva, J. S., Peinado, J. M. (2005). ATP requirements for benzoic acid tolerance in *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 121-126.
- Li, T., Huo, L., Pulley, C., Liu, A. (2012). Decarboxylation mechanisms in biological system. *Bioorganic Chemistry*, 43, 2-14.
- Liewen, M. B., Marth, E. H. (1985). Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: a review. *Journal of Food Protection*, 48, 364-375.
- Lin, W., Li, Z. (2010). Detection and quantification of trace organic contaminants in water using the FT-IR-attenuated total reflectance technique. *Analytical Chemistry*, 82, 505-515.
- Lin, F., Ferguson, K. L., Boyer, D. R., Lin, X. N., Marsh, E. N. G. (2015). Isofunctional enzymes *PAD1* and *UbiX* catalyze formation of a novel cofactor required by ferulic acid decarboxylase and 4-hydroxy-3-polyprenylbenzoic acid decarboxylase. *ACS Chemical Biology*, 10, 1137-1144.
- Linares-Herrero, R., Vergara, G., Gutiérrez-Álvarez, R., Fernández-Montojo, C., Gómez, L. J., Villamayor, V., Balsadano-Ramírez, A., Montojo, M. T. (2012). Variable filter array spectrometer of VPD PbSe. En: SPIE 8354. Thermosense: thermal infrared applications XXXIV, 835412. doi: 10.1117/12.919305.
- Linares-Herrero, R., Vergara, G., Álvarez, R. G., Montojo, C. F., Gómez, L. J., Villamayor, V., Balsadano-Ramírez, A., Montojo, M. T., Archilla, V., Jiménez, A., Mercader D, González, A., Entero, A. (2013). Compact high-speed MWIR spectrometer applied to monitor CO₂ exhaust dynamics from a turbojet engine. En: SPIE 8705. Thermosense: thermal infrared applications XXXV, 87050E. doi: 10.1117/12.2015894.
- Linares, R., Vergara, G., Gutiérrez, R., Fernández, C., Villamayor, V., Gómez, L., González-Camino, M., Baldasano, A. (2015). Gas and flame detection and identification using uncooled MWIR imaging sensors. En: SPIE 9485. Thermosense: thermal infrared applications XXXVII, 94851F. doi: 10.1117/12.2177016.
- Lleó, L., Barreiro, P., Ruíz-Altisent, M., Herrero, A. (2009). Multispectral images of peach related to firmness and maturity at harvest. *Journal of Food Engineering*, 93, 229-235.
- Lobete, M. M., Fernández, E. N., Van Impe, J. F. (2015). Recent trends in non-invasive in situ techniques to monitor bacterial colonies in solid (model) food. *Frontiers in Microbiology*, 6, 148. doi: 10.3389/fmicb.2015.00148.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50, 325-328.
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., France, J. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 289-300.

Lorenzo, C., Garde-Cerdán, T., Pedroza, M. A., Alonso, G. L., Salinas, M. R. (2009). Determination of fermentative volatile compounds in aged red wines by near infrared spectroscopy. *Food Research International*, 42, 1281-1286.

Loureiro, V., Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 356-365.

Loutfi, A., Coradeschi, S., Mani, G. K., Shankar, P., Rayappan, J. B. B. (2015). Electronic noses for food quality: a review. *Journal of Food Engineering*, 144, 103-111.

Lück, E. (1990). Food applications of sorbic acid and its salts. *Food Additives and Contaminants*, 7, 711-715.

Lück, E., Jager, M., Nico Raczek, N. (2011). Sorbic acid. En: Elvers, B. (Ed.). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7 Ed. John Wiley and Sons, Weinheim, Alemania. 715-723.

M

Machiels, D., Istasse, L., van Ruth, S. M. (2004). Gas chromatography-olfactometry analysis of beef meat originating from differently fed Belgian Blue, Limousin and Aberdeen Angus bulls. *Food Chemistry*, 86, 377-383.

Makrantonis, V., Dennison, P., Stark, M. J., Coote, P. J. (2007). A novel role for the yeast protein kinase Dbf2p in vacuolar H⁺-ATPase function and sorbic acid stress tolerance. *Microbiology*, 153, 4016-4026.

Malakar, P. K., Brocklehurst, T. F., Mackie, A. R., Wilson, P. D. G., Zwietering, M. H., Van't Riet, K. (2000). Microgradients in bacterial colonies: use of fluorescence ratio imaging, a non-invasive technique. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 71-80.

Malakar, P. K., Martens, D. E., Van Breukelen, W., Boom, R. M., Zwietering, M. H., Van't Riet, K. (2002). Modeling the interactions of *Lactobacillus curvatus* colonies in solid medium: consequences for food quality and safety. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3432-3441.

Malakar, P. K., Barker, G. C., Zwietering, M. H., Van't Riet, K. (2003). Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 263-272.

Manickavasagan, A., Jayas, D. S., White, N. D. G., Paliwal, J. (2010). Wheat class identification using thermal imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 450-460.

Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. (2016). Preservatives: classifications and analysis. En: Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F. (Eds.). *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, Reino Unido. 497-504.

Mann, D. A., Beuchat, L. R. (2008). Combinations of antimicrobials to inhibit the growth of molds capable of producing 1,3-pentadiene. *Food Microbiology*, 25, 144-153.

Maráz, A., Kovács, M. (2014). Food spoilage by cold-adapted yeasts. En: Buzzini, P., Margesin, R. (Eds.). *Cold-adapted Yeasts*. Springer, Berlín, Alemania. 497-532.

Marín, S., Abellana, M., Rubinat, M., Sanchís, V., Ramos, A. J. (2003). Efficacy of sorbates on the control of the growth of *Eurotium* species in bakery products with near neutral pH. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 251-258.

Marín, S., Ramos, A. J., Sanchís, V. (2005). Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329-341.

- Marín, S., Cuevas, D., Ramos, A. J., Sanchís, V. (2008). Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 139-149.
- Marriott, P. J., Chin, S. T., Maikhunthod, B., Schmarr, H. G., Bieri, S. (2012). Multidimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 34, 1-21.
- Marth, E. H., Capp, C. M., Hasenzahl, L., Jackson, H. W., Hussang, R. V. (1966). Degradation of potassium sorbate by *Penicillium* species. *Journal of Dairy Science*, 49, 1197–1205.
- Martínez-Muñoz, G. A., Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 20309-20319.
- Martínez-Peinado, J., Van Uden, N. (1977). Isothermic variation of the specific growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Archives of Microbiology*, 113, 303-307.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T., Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 234-242.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science*, 71, 157-167.
- Mataragas, M., Dimitriou, V., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H. (2011). Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits. *Food Microbiology*, 28, 611-616.
- Mattila, T., Frost, A. J. (1988). The growth of potential food poisoning organisms on chicken and pork muscle surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 455-461.
- McDonagh, C., Burke, C. S., MacCraith, B. D. (2008). Optical chemical sensors. *Chemical Reviews*, 108, 400-422.
- McKay, A. L., Peters, A. C. (1995). The effect of sodium chloride concentration and pH on the growth of *Salmonella typhimurium* colonies on solid medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 353-359.
- McKay, A. L., Peters, A. C., Wimpenny, J. W. T. (1997). Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 74-76.
- McKellar, R. C. (1997). A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 179-186.
- McKellar, R. C., Lu, X. (2004). Primary models. En: McKellar, R. C., Lu, X. (Eds.). *Modeling microbial responses in food*. CRC Press, Florida, Estados Unidos. 21-62.
- McKellar, R. C., Delaquis, P. (2011). Development of a dynamic growth–death model for *Escherichia coli* O157: H7 in minimally processed leafy green vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 7-14.
- McKenna, R., Nielsen, D. R. (2011). Styrene biosynthesis from glucose by engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 13, 544-554.
- McMeekin, T. A., Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133-153.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ratkowsky, D. A., Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 395-407.

- McMeekin, T. A., Mellefont, L. A., Ross, T. (2007) Predictive microbiology, past, present and future. En: Brul, S., van Gerwen, S., Zwietering, M. (Eds.). *Modelling microorganisms in food*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Reino Unido. 7-21.
- McMeekin, T., Tamplin, M., Ross, T., Koseki, S. (2010). The way forward with predictive microbiology in the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65, 91.
- Melin, P., Stratford, M., Plumridge, A., Archer, D. B. (2008). Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. *Microbiology*, 154, 1251-1257.
- Melnick, D., Luckmann, F. H., Gooding, C. M. (1954). Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. VI. Metabolic degradation of sorbic acid in cheese by molds and the mechanism of mold inhibition. *Journal of Food Science*, 19, 44-58.
- Melzoch, K., Votruba, J., Sekavova, B., Piterkova, L., Rychtera, M. (2004). Thermophilic bacteria colony growth and its consequences in the food industry. *Czech Journal of Food Sciences*, 22, 1-8.
- Memarian, N., Jessulat, M., Alirezaie, J., Mir-Rashed, N., Xu, J., Zareie, Smith, M., Golshani, A. (2007). Colony size measurement of the yeast gene deletion strains for functional genomics. *BMC Bioinformatics*, 8, 117. doi: 10.1186/1471-2105-8-117.
- Mertens, L., Van Derlinden, E., Dang, T. D. T., Cappuyns, A. M., Vermeulen, A., Debevere, J., Moldenaers, P., Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F. (2011). On the critical evaluation of growth/no growth assessment of *Zygosaccharomyces bailii* with optical density measurements: liquid versus structured media. *Food Microbiology*, 28, 736-745.
- Mertens, L., Van Derlinden, E., Van Impe, J. F. (2012). A novel method for high-throughput data collection in predictive microbiology: optical density monitoring of colony growth as a function of time. *Food Microbiology*, 32, 196-201.
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A*, 881, 569-581.
- Meunier, J. R., Choder, M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. *Yeast*, 15, 1159-1169.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77, 1064-1070.
- Milani, E. A., Alkhafaji, S., Silva, F. V. (2015). Pulsed electric field continuous pasteurization of different types of beers. *Food Control*, 50, 223-229.
- Miles, A. A., Misra, S. S., Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38, 732-749.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley and Sons, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- Mináriková, L., Kuthan, M., Řičicová, M., Forstová, J., Palková, Z. (2001). Differentiated gene expression in cells within yeast colonies. *Experimental Cell Research*, 271, 296-304.
- Mira, N. P., Teixeira, M. C., Sá-Correia, I. (2010a). Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *Omics: a Journal of Integrative Biology*, 14, 525-540.

- Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F., Sá-Correia, I. (2010b). Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microbial Cell Factories*, 9, 79. doi: 10.1186/1475-2859-9-79.
- Mira, N. P., Münsterkötter, M., Dias-Valada, F., Santos, J., Palma, M., Roque, F., Guerreiro, J., Rodrigues, F., Sousa, M. J., Leão, C., Guldener, U., Sá-Correia, I. (2014). The genome sequence of the highly acetic acid-tolerant *Zygosaccharomyces bailii* derived interspecies hybrid strain ISA1307, isolated from a sparkling wine plant. *DNA Research*, 21, 299-313.
- Mishra, A., Guo, M., Buchanan, R. L., Schaffner, D. W., Pradhan, A. K. (2016). Development of growth and survival models for *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* during non-isothermal time-temperature profiles in leafy greens. *Food Control*, 71, 32-41.
- Mitchell, A. J., Wimpenny, J. W. T. (1997). The effects of agar concentration on the growth and morphology of submerged colonies of motile and non-motile bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 76-84.
- Molski, M., Konarski, J. (2003). Coherent states of Gompertzian growth. *Physical Review E*, 68, 021916. doi: 10.1103/PhysRevE.68.021916.
- Moeder, M. (2014). Gas chromatography-mass spectrometry. En: Dettmer-Wilde, K., Werner, I. (Eds.). *Practical gas chromatography*. Springer, Berlín, Alemania. 303-350.
- Mollapour, M., Piper, P. W. (2001a). Targeted gene deletion in *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*, 18, 173-186.
- Mollapour, M., Piper, P. W. (2001b). The *ZbYME2* gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YME2 functions in *Saccharomyces cerevisiae*, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives. *Molecular Microbiology*, 42, 919-930.
- Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schüller, K., Kuchler, K., Piper, P. W. (2004). Screening the yeast deletion mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast*, 21, 927-946.
- Mollapour, M., Shepherd, A., Piper, P. W. (2008). Novel stress responses facilitate *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of the monocarboxylate preservatives. *Yeast*, 25, 169-177.
- Montaño, A., Sánchez, A. H., Casado, F. J., Beato, V. M., de Castro, A. (2013). Degradation of ascorbic acid and potassium sorbate by different *Lactobacillus* species isolated from packed green olives. *Food Microbiology*, 34, 7-11.
- Moragas, M., Pablo, D. (2015). Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados (superficies, aguas diferentes de consumo, aire, subproductos). Otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. *Departamento de sanidad del gobierno vasco*.
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., Iefuji, H. (2010). *PAD1* and *FDC1* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 564-569.
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Iefuji, H. (2014). Single nucleotide polymorphisms of *PAD1* and *FDC1* show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 50-55.

Mulrooney, J., Clifford, J., Fitzpatrick, C., Lewis, E. (2007). Detection of carbon dioxide emissions from a diesel engine using a mid-infrared optical fibre based sensor. *Sensors and Actuators A: Physical*, 136, 104-110.

Muñoz-Cuevas, M., Fernández, P. S., George, S., Pin, C. (2010). Modeling the lag period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2908-2915.

Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., Lambert, R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 169-176.

Mytilinaios, I., Bernigaud, I., Belot, V., Lambert, R. J. W. (2015). Microbial growth parameters obtained from the analysis of time to detection data using a novel rearrangement of the Baranyi–Roberts model. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 161-174.

N

Naranjo, E., Baliga, S. (2012). Early detection of combustible gas leaks using open path infrared (IR) gas detectors. En: SPIE 8336, Advanced environmental, chemical and biological sensing technologies IX, 83660V. doi: 10.1117/12.919201.

Neal, A. L., Weinstock, J. O., Lampen, J. O. (1965). Mechanisms of fatty acid toxicity for yeast. *Journal of Bacteriology*, 90, 126-131.

Needham, R., Williams, J., Beales, N., Voysey, P., Magan, N. (2005). Early detection and differentiation of spoilage of bakery products. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106, 20-23.

Neves, M. L., Oliveira, R. P., Lucas, C. M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 143, 1133-1139.

Nielsen, D. R., McKenna, R. (2015). Microbial conversion of glucose to styrene and its derivatives. *U.S. Patent No.* US9150884 B2.

Nieminen, T., Neubauer, P., Sivelä, S., Vatamo, S., Silfverberg, P., Salkinoja-Salonen, M. (2008). Volatile compounds produced by fungi grown in strawberry jam. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 2051-2056.

Nithyaja, B., Jisha, V. K., Tintu, R., Saramma, A. V., Nampoori, V. P. N. (2009). Kinetics of bacterial colony growth by laser induced fluorescence. *Laser Physics*, 19, 468-472.

Noriega, E., Laca, A., Diaz, M. (2010). Development of a structure-based model for the competitive growth of *Listeria innocua* in minced chicken breasts. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 44-52.

Nyman, P. J., Diachenko, G. W., Perfetti, G. A., McNeal, T. P., Hiatt, M. H., Morehouse, K. M. (2007). Survey results of benzene in soft drinks and other beverages by headspace gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 571-576.

O

Oliveros, M. C. C., Pavón, J. L. P., Pinto, C. G., Laespada, M. E. F., Cordero, B. M., Forina, M. (2002). Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils. *Analytica Chimica Acta*, 459, 219-228.

Opara, U. L., Pathare, P. B. (2014). Bruise damage measurement and analysis of fresh horticultural produce—a review. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 9-24.

P

Padilla, B., Manzanares, P., Belloch, C. (2014). Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional 'ewes' and 'goats' cheeses. *Food Microbiology*, 38, 160-166.

Pal, A., Labuza, T. P., Díez-González, F. (2008). Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. *Food Microbiology*, 25, 460-470.

Palková, Z., Janderová, B., Zikánová, B., Pospíšek, M., Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, 390, 532-536.

Palková, Z., Váchová, L., Gášková, D., Kučerová, H. (2009). Synchronous plasma membrane electrochemical potential oscillations during yeast colony development and aging. *Molecular Membrane Biology*, 26, 228-235.

Palumbo, S. A., Johnson, M. G., Rieck, V. T., Witter, L. D. (1971). Growth measurements on surface colonies of bacteria. *Journal of General Microbiology*, 66, 137-143.

Panikov, N. S., Belova, S. E., Dorofeev, A. G. (2002). Nonlinearity in the growth of bacterial colonies: conditions and causes. *Microbiology*, 71, 50-56.

Panagou, E. Z., Nychas, G. J. E. (2008). Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized vanilla cream after postprocessing contamination. *Journal of Food Protection*, 71, 1828-1834.

Panigrahi, S., Balasubramanian, S., Gu, H., Logue, C. M., Marchello, M. (2006). Design and development of a metal oxide based electronic nose for spoilage classification of beef. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119, 2-14.

Papadimitriou, M. N., Resende, C., Kuchler, K., Brul, S. (2007). High Pdr12 levels in spoilage yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) correlate directly with sorbic acid levels in the culture medium but are not sufficient to provide cells with acquired resistance to the food preservative. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 173-179.

Parker, J. K., Elmore, S., Methven, L. (2015). Flavour development, analysis and perception in food and beverages. Elsevier Ltd., Cambridge, Reino Unido.

Patil, S., Valdramidis, V. P., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Bourke, P. (2011). Quantitative assessment of the shelf life of ozonated apple juice. *European Food Research and Technology*, 232, 469-477.

Patrignani, F., Chinnici, F., Serrazanetti, D. I., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Riponi, C., Lanciotti, R. (2016). Production of volatile and sulfur compounds by 10 *Saccharomyces cerevisiae* strains inoculated in trebbiano must. *Frontiers in Microbiology*, 7, 243. doi: 10.3389/fmicb.2016.00243.

Payne, K. A., White, M. D., Fisher, K., Khara, B., Bailey, S. S., Parker, D., Rattray, N. J. W., Trivedi, D. K., Goodacre, R., Beveridge, R., Barran, P., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S., Hay, S., Leys, D. (2015). New cofactor supports α,β -unsaturated acid decarboxylation via 1, 3-dipolar cycloaddition. *Nature*, 522, 497-501.

Pearce, A. K., Booth, I. R., Brown, A. J. P. (2001). Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6- bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 147, 403-410.

- Peleg, M., Corradini, M. G. (2011). Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 917-945.
- Perni, S., Andrew, P. W., Shama, G. (2005). Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology*, 22, 491-495.
- Peters, A. C., Wimpenny, J. W. T., Coombs, J. P. (1987). Oxygen profiles in, and in the agar beneath, colonies of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus* and *Escherichia coli*. *Microbiology*, 133, 1257-1263.
- Pinches, S. E., Apps, P. (2007). Production in food of 1,3-pentadiene and styrene by *Trichoderma* species. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 182-185.
- Piñeiro-Ave, J., Blanco-Velasco, M., Cruz-Roldán, F., Artés-Rodríguez, A. (2014). Target detection for low cost uncooled MWIR cameras based on empirical mode decomposition. *Infrared Physics and Technology*, 63, 222-231.
- Pipe, L. Z., Grimson, M. J. (2008). Spatial-temporal modelling of bacterial colony growth on solid media. *Molecular BioSystems*, 4, 192-198.
- Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., Cole, M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane ATPase. *Cell Stress and Chaperones*, 2, 12-24.
- Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P., Kuchler, K. (1998). The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO Journal*, 17, 4257-4265.
- Piper, P. W. (1999). Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1219-1227.
- Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K., Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147, 2635-2642.
- Piper, P. W. (2011). Resistance of yeasts to weak organic acid food preservatives. *Advances in Applied Microbiology*, 77, 97-113.
- Pirt, S. J. (1967). A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. *Microbiology*, 47, 181-197.
- Pirt, S. J. (1975). Growth of microbial colonies on the surface of solid medium. En: Pirt, S. J. (Ed.). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido. 276-285.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009). Yeast. En: Pitt, J. I., Hocking, A. D. (Eds.). Fungi and food spoilage, 3 Ed. Springer, Berlín, Alemania. 357-382.
- Pla, M. L., Ultra, S., Esteban, M. D., Andreu, S., Palop, A. (2015). Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods. *BioMed Research International*, 2015, 365025. doi: 10.1155/2015/365025.
- Plumridge, A., Stratford, M., Lowe, K. C., Archer, D. B. (2008). The weak-acid preservative sorbic acid is decarboxylated and detoxified by a phenylacrylic acid decarboxylase, PadA1, in the spoilage mold *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 550-552.

Plumridge, A., Melin, P., Stratford, M., Novodvorska, M., Shunburne, L., Dyer, P. S., Roubos, J. A., Menke, H., Stark, J., Stam, H., Archer, D. B. (2010). The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in *Aspergillus* spp. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 683-692.

Plutowska, B., Wardencki, W. (2008). Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages—a review. *Food Chemistry*, 107, 449-463.

Pronk, J. T., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1607-1633.

Puchkov, E. O. (2010). Computer image analysis of microbial colonies. *Microbiology*, 79, 141-146.

Puerta-Gómez, A. F., Moreira, R. G., Kim, J., Castell-Pérez, E. (2013). Modeling the growth rates of *Escherichia coli* spp. and *Salmonella Typhimurium* LT2 in baby spinach leaves under slow cooling. *Food Control*, 29, 11-17.

Puligundla, P., Jung, J., Ko, S. (2012). Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. *Food Control*, 25, 328-333.

Q

Quintas, C., Leyva, J. S., Sotoca, R., Loureiro-Dias, M. C., Peinado, J. M. (2005). A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 125-130.

Quirós, M., Martorell, P., Querol, A., Barrio, E., Peinado, J. M., de Silóniz, M. I. (2008). Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): taxonomic and phylogenetic implications. *FEMS Yeast Research*, 8, 485-491.

R

Ragazzo-Sánchez, J. A., Chalier, P., Chevalier-Lucia, D., Calderón-Santoyo, M., Ghommidh, C. (2009). Off-flavours detection in alcoholic beverages by electronic nose coupled to GC. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140, 29-34.

Raichlin, Y., Katzir, A. (2008). Fiber-optic evanescent wave spectroscopy in the middle infrared. *Applied Spectroscopy*, 62, 55-72.

Rakow, N. A., Suslick, K. S. (2000). A colorimetric sensor array for odour visualization. *Nature*, 406, 710-713.

Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339, 62-66.

Rangarajan, E. S., Li, Y., Iannuzzi, P., Tocilj, A., Hung, L. W., Matte, A., Cygler, M. (2004). Crystal structure of a dodecameric FMN-dependent UbiX-like decarboxylase (Pad1) from *Escherichia coli* O157: H7. *Protein Science*, 13, 3006-3016.

Raso, J., Condón, S., Álvarez, I. (2014). Non-thermal processing | pulsed electric field. En: Batt, C. A. (Ed.). *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2 Ed. Elsevier Ltd., Londres, Reino Unido. 963-973.

Rattanabumrung, O., Sangadkit, V., Supanivatin, P., Thipayarat, A. (2012). Kinetics of *E. coli* colony area expansion and color development in Chromocult® Coliform Agar (CCA) under different incubation conditions. *Procedia Engineering*, 32, 134-140.

Reid, W. J. (2003). Instrumental methods in detecting taints and off-flavours. En: Baigrie, B. (Ed.). *Taints and off-flavours in foods*. CRC Press, Cambridge, Reino Unido. 31-63.

- Reyrolle, J., Letellier, F. (1979). Autoradiographic study of the localization and evolution of growth zones in bacterial colonies. *Microbiology*, 111, 399-406.
- Richard, P., Viljanen, K., Penttilä, M. (2015). Overexpression of *PAD1* and *FDC1* results in significant cinnamic acid decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 5, 12. doi: 10.1186/s13568-015-0103-x.
- Ridgway, K., Lalljie, S. P., Smith, R. M. (2010). Analysis of food taints and off-flavours: a review. *Food Additives and Contaminants*, 27, 146-168.
- Ridgway, K., Lalljie, S. P. D. (2011). Food taints and off- flavors. En: Jelen, H. (Ed.). *Food flavors: chemical, sensory and technological properties*. CRC Press, Florida, Estados Unidos. 335-353.
- Ridgway, K. (2015). Analysis of taints and off-flavours. En: Parker, J. K., Elmore, S., Methven, L. (Eds.). *Flavour development, analysis and perception in food and beverages*. Elsevier Ltd., Cambridge, Reino Unido. 63-82.
- Riquelme, M. T., Barreiro, P., Ruiz-Altisent, M., Valero, C. (2008). Olive classification according to external damage using image analysis. *Journal of Food Engineering*, 87, 371-379.
- Rivas, E. M., Gil de Prado, E., Wrent, P., Silóniz, M. I., Barreiro, P., Correa, E. C., Conejero, F., Murciano, A., Peinado, J. M. (2014). A simple mathematical model that describes the growth of the area and the number of total and viable cells in yeast colonies. *Letters in Applied Microbiology*, 59, 594-603.
- Rivas, E. M., Maldonado, M., Diezma, B., Wrent, P., Peinado, J. M., de Silóniz, M. I., Vergara, G., García-Hierro, J., Robla, J-I., Barreiro, P. (2016). Detection of biological CO₂ and 1,3-pentadiene using non-refrigerated low-cost MWIR detectors. *Food Analytical Methods*, 9, 1451-1460.
- Robert, X., Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42, 320-324.
- Robinson, A., Sadr-Kazemi, N., Dickason, G., Harrison, S. T. L. (1998). Morphological characterisation of yeast colony growth on solid media using image processing. *Biotechnology Techniques*, 12, 763-767.
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Heymann, H., Solomon, P. S., Trengove, R. D. (2011). Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 504-517.
- Rodin, V. B., Panikov, N. S. (1995). Colony growth of unicellular microorganisms: a two-dimensional model and its experimental testing. *Mikrobiologiya*, 64, 485-491.
- Rogalski, A. (2011). Recent progress in infrared detector technologies. *Infrared Physics and Technology*, 54, 136-154.
- Rogalski, A. (2012). History of infrared detectors. *Opto-Electronics Review*, 20, 279-308.
- Rojo, M. C., López, F. A., Lerena, M. C., Mercado, L., Torres, A., Combina, M. (2014). Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiology*, 38, 143-150.
- Ronning, I. E., Frank, H. A. (1987). Growth inhibition of putrefactive anaerobe 3679 caused by stringent type response induced by protonophoric activity of sorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1020-1027.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 501-508.

Ross, T., McMeekin, T. A. (2003). Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Analysis*, 23, 179–197.

Ross, T., Dalgaard, O. (2004). Secondary models. En: McKellar, R. C., Lu, X. (Eds.). Modeling microbial responses in food. CRC Press, Florida, Estados Unidos. 63-150.

Rossi, F., Gaio, E., Torriani, S. (2010). *Staphylococcus aureus* and *Zygosaccharomyces bailii* as primary microbial contaminants of a spoiled herbal food supplement and evaluation of their survival during shelf life. *Food Microbiology*, 27, 356-362.

Rubiolo, P., Cagliero, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Bicchi, C. (2014). Gas chromatography in the analysis of flavours and fragrances. En: Dettmer-Wilde, K., Engewald, W. (Eds.). Practical gas chromatography. Springer, Berlín, Alemania. 717-743.

Rudnicka, J., Kowalkowski, T., Ligor, T., Buszewski, B. (2011). Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME–GC–TOF/MS and chemometrics. *Journal of Chromatography B*, 879, 3360-3366.

Ruiz-Altisent, M., Ruiz-García, L., Moreda, G. P., Lu, R., Hernández-Sánchez, N., Correa, E. C., Diezma, B., Nicolai, B., García-Ramos, J. (2010). Sensors for product characterization and quality of specialty crops— a review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 74, 176-194.

Ruiz Pérez-Cacho, P., Mahattanatawee, K., Smoot, J. M., Rouseff, R. (2007). Identification of sulfur volatiles in canned orange juices lacking orange flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5761-5767.

Russell, N. (2009). Psychrophily and resistance to low temperature. En: Gerday, C., Glandsdorff, N. (Eds.). Extremophiles, vol. 2. Eolss Publishers, Oxford, Reino Unido. 1-32.

Ruth, J. H. (1986). Odor thresholds and irritation levels of several chemical substances: a review. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 47, 142-151.

Rychlik, M., Bosset, J. O. (2001). Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Evaluation of potent odorants. *International Dairy Journal*, 11, 895-901.

S

Sá-Correia, I., Van Uden, N. (1986). Ethanol-induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 301-306.

Sakha, M. Z., Fujikawa, H. (2013). Prediction of *Salmonella enteritidis* growth in pasteurized and unpasteurized liquid egg products with a growth model. *Biocontrol Science*, 18, 89-93.

Salemi, A., Lacorte, S., Bagheri, H., Barcelo, D. (2006). Automated trace determination of earthy-musty odorous compounds in water samples by on-line purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136,170-175.

Salmond, C. V., Kroll, R. G., Booth, I. R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 130, 2845-2850.

Salvesen, I., Vadstein, O. (2000). Evaluation of plate count methods for determination of maximum specific growth rate in mixed microbial communities, and its possible application for diversity assessment. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 442-448.

- Saxby, M. J. (1993). *Food taints and off-flavours*, 1 Ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Reino Unido.
- Schädle, T., Pejčic, B., Myers, M., Mizaikoff, B. (2016). Portable mid-infrared sensor system for monitoring CO₂ and CH₄ at high pressure in geosequestration scenarios. *ACS Sensors*, 1, 413-419.
- Scharf, T., Briand, D., Bühler, S., Manzardo, O., Herzig, H. P., De Rooij, N. F. (2009). Gas detection with a micro FTIR spectrometer in the MIR region. *Procedia Chemistry*, 1, 1379-1382.
- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *Journal of Molecular Medicine*, 84, 901-910.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A., Trumppower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18, 3091-3092.
- Schüller, C., Mamnun, Y. M., Mollapour, M., Krapf, G., Schuster, M., Bauer, B. E., Piper, P. W., Kuchler, K. (2004). Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 706-720.
- Schvartzman, M. S., González-Barron, U., Butler, F., Jordan, K. (2014). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear- or mold-ripened cheese. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 90. doi: 10.3389/fcimb.2014.00090.
- Schwarz, K. J., Boitz, L. I., Methner, F. J. (2012). Enzymatic formation of styrene during wheat beer fermentation is dependent on pitching rate and cinnamic acid content. *Journal of the Institute of Brewing*, 118, 280-284.
- Scott, W. J. (1937). The growth of microorganisms on ox muscle: II. The influence of temperature. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research of Australia*, 10, 338-350.
- Senni, L., Ricci, M., Palazzi, A., Burrascano, P., Pennisi, P., Ghirelli, F. (2014). On-line automatic detection of foreign bodies in biscuits by infrared thermography and image processing. *Journal of Food Engineering*, 128, 146-156.
- Sensidoni, A., Rondinini, G., Peressini, D., Maifreni, M., Bortolomeazzi, R. (1994). Presence of an off-flavour associated with the use of sorbates in cheese and margarine. *Italian Journal of Food Science*, 6, 237-242.
- Serrano, R. (1984). Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Current Topics in Cellular Regulation*, 23, 87-126.
- Shao, Y., Bao, Y., He, Y. (2011). Visible/near-infrared spectra for linear and nonlinear calibrations: a case to predict soluble solids contents and pH value in peach. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1376-1383.
- Shapiro, J. A., Hsu, C. (1989). *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video. *Journal of Bacteriology*, 171, 5963-5974.
- Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 90-97.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539. doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Simoës, T., Mira, N. P., Fernandes, A. R., Sá-Correia, I. (2006). The *SPI1* gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, plays a prominent role in the development of

yeast resistance to lipophilic weak-acid food preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7168-7175.

Sinelli, N., Casiraghi, E., Downey, G. (2008). Studies on proofing of yeasted bread dough using near-and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 922-931.

Skandamis, P. N., Brocklehurst, T. F., Panagou, E. Z., Nychas, G. J. (2007). Image analysis as a mean to model growth of *Escherichia coli* O157: H7 in gel cassettes. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 937-947.

Skandamis, P. N., Jeanson, S. (2015). Colonial vs. planktonic type of growth: mathematical modeling of microbial dynamics on surfaces and in liquid, semi-liquid and solid foods. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1178. doi: 10.3389/fmicb.2015.01178.

Smyth, H., Cozzolino, D. (2012). Instrumental methods (spectroscopy, electronic nose, and tongue) as tools to predict taste and aroma in beverages: advantages and limitations. *Chemical Reviews*, 113, 1429-1440.

Sofos, J. N. (1989). Sorbate food preservatives, CRC Press, Florida, Estados Unidos.

Sofos, J. N., Busta, F. F. (1993). Sorbic acid and sorbates. En: Davidson, P. M., Branen A. L. (Eds.). Antimicrobials in foods. Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos. 49-94.

Souza, C. M., Schwabe, T. M., Pichler, H., Ploier, B., Leitner, E., Guan, X. L., Wenk, M. R., Riezman, I., Riezman, H. (2011). A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. *Metabolic Engineering*, 13, 555-569.

Stecchini, M. L., Torre, M. D., Donda, S., Maltini, E. (2000). Growth of *Bacillus cereus* on solid media as affected by agar, sodium chloride, and potassium sorbate. *Journal of Food Protection*, 63, 926-929.

Steels, H., James, S. A., Roberts, I. N., Stratford, M. (2000). Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast*, 16, 1173-1183.

Stopforth, J. D., Sofos, J. N., Busta, F. F. (2005). Sorbic acid and sorbates. En: Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L. (Eds.). Antimicrobials in food. Taylor and Francis, Nueva York, Estados Unidos. 49-75.

Stratford, M., Rose, A. H. (1986). Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132, 1-6.

Stratford, M., Anslow, P. A. (1996). Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 142, 53-58.

Stratford, M., Anslow, P. A. (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 203-206.

Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeasts. En: Querol, A., Fleet, G. (Eds.). Yeasts in food and beverages. Springer, Berlín, Alemania. 335-379.

Stratford, M., Plumridge, A., Archer, D. B. (2007). Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the *PAD1* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6534-6542.

Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., Archer, D. B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 37-43.

Stratford, M., Plumridge, A., Pleasants, M. W., Novodvorska, M., Baker-Glenn, C. A., Pattenden, G., Archer, D. B. (2012). Mapping the structural requirements of inducers and substrates for decarboxylation of weak acid preservatives by the food spoilage mould *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 375-383.

Stratford, M., Nebe-von-Caron, G., Steels, H., Novodvorska, M., Teckert, J., Archer, D. B. (2013a). Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 164-171.

Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., Archer, D. B. (2013b). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 126-134.

Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Avery, S. V., Novodvorska, M., Archer, D. B. (2014). Population heterogeneity and dynamics in starter culture and lag phase adaptation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* to weak acid preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 40-47.

Stuart, B. (2004). Infrared spectroscopy: fundamental and applications. John Wiley and Sons, Cambridge, Reino Unido.

Su, P. T., Liao, C. T., Roan, J. R., Wang, S. H., Chiou, A., Syu, W. J. (2012). Bacterial colony from two-dimensional division to three-dimensional development. *PLoS One*, 7, e48098. doi: 10.1371/journal.pone.0048098.

T

Takeuchi, R., Tamura, T., Nakayashiki, T., Tanaka, Y., Muto, A., Wanner, B. L., Mori, H. (2014). Colony-live—a high-throughput method for measuring microbial colony growth kinetics—reveals diverse growth effects of gene knockouts in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 14, 171. doi: 10.1186/1471-2180-14-171.

Tay, A., Singh, R. K., Krishnan, S. S., Gore, J. P. (2002). Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 99-103.

Tenenhaus-Aziza, F., Ellouze, M. (2015). Software for predictive microbiology and risk assessment: a description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, 45, 290-299.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2013, 251754. doi: 10.1155/2013/251754.

Ter Beek, A., Wijman, J. G., Zakrzewska, A., Orij, R., Smits, G. J., Brul, S. (2015). Comparative physiological and transcriptional analysis of weak organic acid stress in *Bacillus subtilis*. *Food Microbiology*, 45, 71-82.

Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Tlrih, N. P., Abramovič, H. (2011). Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*, 128, 62-69.

Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Verhulst, A., Poot, K., Van Bree, I., Devlieghere, F., Moldenaers, P., Wilson, D., Brocklehurst, T., Van Impe, J. F. (2008). Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 67-77.

Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Devlieghere, F., Van Impe, J. F. (2009). Extracting information on the evolution of living-and dead-cell fractions of *Salmonella typhimurium* colonies in gelatin gels based on microscopic images and plate-count data. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 39-45.

Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Devlieghere, F., Van Impe, J. F. (2010). On the selection of relevant environmental factors to predict microbial dynamics in solidified media. *Food Microbiology*, 27, 220-228.

Thomas, L. V., Delves-Broughton, J. (2014). Permitted preservatives – sorbic acid. En: Batt, C. A, Tortorello, M. L. (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Ltd., Londres, Reino Unido. 102-107.

Thurston, P. A., Tubb, R. S. (1981). Screening yeast strains for their ability to produce phenolic off-flavours: a simple method for determining phenols in wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 87, 177-179.

Torres, E. F., Rodrigo, D., Martínez, A. (2016). Preservation of foods. En: Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F. (Eds.). *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, Reino Unido. 491-496.

Torri, L., Sinelli, N., Limbo, S. (2010). Shelf life evaluation of fresh-cut pineapple by using an electronic nose. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 239-245.

Traven, A., Jänicke, A., Harrison, P., Swaminathan, A., Seemann, T., Beilharz, T. H. (2012). Transcriptional profiling of a yeast colony provides new insight into the heterogeneity of multicellular fungal communities. *PLoS One*, 7, e46243. doi: 10.1371/journal.pone.0046243.

Trinci, A. P. J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Microbiology*, 57, 11-24.

Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 480-486.

Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. *Food Chemistry*, 137, 108-114.

U

Ullah, A., Orij, R., Brul, S., Smits, G. J. (2012). Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8377-8387.

Ullah, A., Chandrasekaran, G., Brul, S., Smits, G. J. (2013). Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in Microbiology*, 4, 142. doi: 10.3389/fmicb.2013.00142.

V

Váchová, L., Palková, Z. (2005). Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *The Journal of Cell Biology*, 169, 711-717.

Váchová, L., Palková, Z. (2011). Aging and longevity of yeast colony populations: metabolic adaptation and differentiation. *Biochemical Society Transactions*, 39, 1471-1475.

Váchová, L., Šťovíček, V., Hlaváček, O., Chernyavskiy, O., Štěpánek, L., Kubínová, L., Palková, Z. (2011). Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *The Journal of Cell Biology*, 194, 679-687.

Váchová, L., Čáp, M., Palková, Z. (2012). Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 601836. doi: 10.1155/2012/601836.

Váchová, L., Hatáková, L., Čáp, M., Pokorná, M., Palková, Z. (2013). Rapidly developing yeast microcolonies differentiate in a similar way to aging giant colonies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 102485. doi: 10.1155/2013/102485.

Valero, C., Barreiro, P., Ruíz-Altisent, M., Cubeddu, R., Pifferi, A., Taroni, P., Torricelli, A., Valentini, G., Johnson, D., Dover, C. (2005). Mealiness detection in apples using time resolved reflectance spectroscopy. *Journal of Textures Studies*, 36, 439-458.

Van Beek, S., Priest, F. G. (2000). Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5322-5328.

Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107, 221-230.

Van Impe, J. F., Nicolai, B. M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., Vandewalle, J. (1992). Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2901-2909.

Van Impe, J. F., Poschet, F., Geeraerd, A. H., Vereecken, K. M. (2005). Towards a novel class of predictive microbial growth models. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 97-105.

Van Urk, H., Voll, W. L., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. (1990). Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 281-287.

Vazquez-Landaverde, P. A., Torres, J. A., Qian, M. C. (2006). Quantification of trace volatile sulfur compounds in milk by solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Dairy Science*, 89, 2919-2927.

Vergara, G., Montojo, M. T., Torquemada, M. C., Rodrigo, M. T., Sánchez, F. J., Gómez, L. J., Almazán, R. M., Verdú, M., Rodríguez, P., Villamayor, V., Álvarez, M., Diezhandino, J., Plaza, Catalán, I. (2007). Polycrystalline lead selenide: the resurgence of an old infrared detector. *Opto-Electronics Review*, 15, 110-117.

Vergara, G., Linares-Herrero, R., Gutiérrez-Álvarez, R., Montojo, M. T., Fernández-Montojo, C., Baldasano-Ramírez, A., Fernández-Berzosa, G. (2011). VPD PbSe technology fills the existing gap in uncooled low-cost and fast IR imagers. En: SPIE 8012, Infrared technology and applications XXXVII, 80121Q. doi: 10.1117/12.884018.

Vulin, C., Di Meglio, J. M., Lindner, A. B., Daerr, A., Murray, A., Hersen, P. (2014). Growing yeast into cylindrical colonies. *Biophysical Journal*, 106, 2214-2221.

W

Walker R. (1990). Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives and Contaminants*, 7, 671-676.

Walker, S. L., Brocklehurst, T. F., Wimpenny, J. W. T. (1997). The effects of growth dynamics upon pH gradient formation within and around subsurface colonies of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 610-614.

Walther, T., Reinsch, H., Weber, P., Ostermann, K., Deutsch, A., Bley, T. (2011). Applying dimorphic yeasts as model organisms to study mycelial growth: Part 1. Experimental investigation of the spatio-temporal development of filamentous yeast colonies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, 13-20.

Wang, W., Paliwal, J. (2007). Near-infrared spectroscopy and imaging in food quality and safety. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 1, 193-207.

- Wang, H., Hu, Z., Long, F., Guo, C., Yuan, Y., Yue, T. (2015). Detection of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida tropicalis* in a high-sugar medium by a metal oxide sensor–based electronic nose and comparison with test panel evaluation. *Journal of Food Protection*, 78, 2052-2063.
- Wareing, P., Davenport, R. R. (2008). Microbiology of soft drinks and fruit juices. En: Ashurst, P. R. (Ed.). Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices. Blackwell Publishing, London, Reino Unido. 279-297.
- Warth, A. D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2091-2095.
- Warth, A. D. (1989). Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of General Microbiology*, 135, 1383-1390.
- Westbrook, J., Feng, Z., Chen, L., Yang, H., Berman, H. M. (2003). The protein data bank and structural genomics. *Nucleic Acids Research*, 31, 489-491.
- White, M. D., Payne, K. A., Fisher, K., Marshall, S. A., Parker, D., Rattray, N. J., Trivedi, D. L., Goodacre, R., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S., Hay, S., Leys, D. (2015). UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis. *Nature*, 522, 502-506.
- Whitfield, F. B., Freeman, D. J., Shaw, K. J. (1983). Trimethylarsine; an important off-flavour component in some prawn species. *Chemistry and Industry*, 20, 786-787.
- Whiting, R. C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 467-494.
- Whiting, R. C., Buchanan, R. L. (1993). A classification of models in predictive microbiology-reply. *Food Microbiology*, 10, 175-177.
- Wilkes, J. G., Conte, E. D., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J. B., Miller, D. W. (2000). Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*, 880, 3-33.
- Wilkins, K., Larsen, K. (1996). Volatile organic compounds from garden waste. *Chemosphere*, 32, 2049-2055.
- Williams, D. J., Wadsworth, W., Salvaggio, C., Messinger, D. W. (2006). A hybrid thermal video and FTIR spectrometer system for rapidly locating and characterizing gas leaks. En: SPIE 6299, Remote sensing of aerosol and chemical gases, model simulation/assimilation, and applications to air quality, 62990O. doi: 10.1117/12.679579.
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J. Wimpenny, J. W. T., Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 275-289.
- Wilson, A. D., Oberle, C. S., Oberle, D. F. (2013). Detection of off-flavor in catfish using a conducting polymer electronic-nose technology. *Sensors*, 13, 15968-15984.
- Wimpenny, J. W. (1979). The growth and form of bacterial colonies. *Microbiology*, 114, 483-486.
- Wimpenny, J. W. T., Coombs, J. P. (1983). Penetration of oxygen into bacterial colonies. *Microbiology*, 129, 1239-1242.

Wimpenny, J. W. T., Leistner, L., Thomas, L. V., Mitchell, A. J., Katsaras, K., Peetz, P. (1995a). Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 299-315.

Wimpenny, J., Wilkinson, T., Peters, A. (1995b). Monitoring microbial colony growth using image-analysis techniques. *Binary-Computing in Microbiology*, 7, 14-18.

Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 75-85.

Wrent, P., Rivas, E. M., Peinado, J. M., de Silóniz, M. I. (2010). Strain typing of *Zygosaccharomyces* yeast species using a single molecular method based on polymorphism of the intergenic spacer region (IGS). *International Journal of Food Microbiology*, 142, 89-96.

Wrent, P., Rivas, E. M., de Prado, E. G., Peinado, J. M., de Silóniz, M. I. (2015a). Assessment of the factors contributing to the growth or spoilage of *Meyerozyma guilliermondii* in organic yogurt: comparison of methods for strain differentiation. *Microorganisms*, 3, 428-440.

Wrent, P., Rivas, E. M., de Prado, E. G., Peinado, J. M., de Silóniz, M. I. (2015b). Development of species-specific primers for rapid identification of *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 109-113.

Wrent, P., Rivas, E. M., Peinado, J. M., de Silóniz, M. I. (2016). Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 1-6.

Wright, K. M., Coleman, H. P., Mackie, A. R., Parker, M. L., Brocklehurst, T. F., Wilson, D. R., Hills, B. P. (2000). Determination of mean growth parameters of bacterial colonies immobilized in gelatin gel using a laser gel-cassette scanner. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 75-89.

Wyszynski, B., Nakamoto, T. (2015). Chemical sensors. En: Parker, J. K., Elmore, S., Methven, L. (Eds.). Flavour development, analysis and perception in food and beverages. Elsevier Ltd., Cambridge, Reino Unido. 83-104.

Y

Yang, J., Her, J. W. (1999). Gas-assisted IR-ATR probe for detection of volatile compounds in aqueous solutions. *Analytical Chemistry*, 71, 1773-1779.

Yang, J., Ramesh, A. (2005). Membrane-introduced infrared spectroscopic chemical sensing method for the detection of volatile organic compounds in aqueous solutions. *Analyst*, 130, 397-403.

Ye, M., Gao, Z., Li, Z., Yuan, Y., Yue, T. (2016). Rapid detection of volatile compounds in apple wines using FT-NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 190, 701-708.

Yu, H. C., Wang, J., Xu, Y. (2007). Identification of adulterated milk using electronic nose. *Sensors and Materials*, 19, 275-285.

Yu, H., Wang, Y., Wang, J. (2009). Identification of tea storage times by linear discrimination analysis and back-propagation neural network techniques based on the eigenvalues of principal components analysis of e-nose sensor signals. *Sensors*, 9, 8073-8082.

Z

Zakrzewska, A., van Eikenhorst, G., Burggraaff, J. E. C., Daniel, J., Vis, D. J., Huub Hoefsloot, H., Delneri, D., Oliver, S. G., Stanley Brul, S., Smits, G. J. (2011). Genome-wide analysis of yeast stress survival and

tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness. *Molecular Biology of the Cell*, 22, 4435-4446.

Zellner, B. D. A., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L. (2008). Gas chromatography–olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A*, 1186, 123-143.

Zhang, L., Pantuso, F. P., Jin, G., Mazurenko, A., Erdtmann, M., Radhakrishnan, S., Salerno, J. (2011). High-speed uncooled MWIR hostile fire indication sensor. En: SPIE 8012, Infrared technology and applications XXXVII, 801219. doi:10.1117/12.884591.

Zhang, C., Wang, C., Liu, F., He, Y. (2016). Mid-infrared spectroscopy for coffee variety identification: comparison of pattern recognition methods. *Journal of Spectroscopy*, 2016, 7927286. doi:10.1155/2016/7927286.

Zimmermann, M., Miorelli, S., Massaguer, P. R., Aragão, G. M. F. (2011). Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 239-243.

Zosel, J., Oelßner, W., Decker, M., Gerlach, G., Guth, U. (2011). The measurement of dissolved and gaseous carbon dioxide concentration. *Measurement Science and Technology*, 22, 072001. doi: 10.1088/0957-0233/22/7/072001.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.

Zwietering, M. H., Wijtzes, T., De Wit, J. C., Van't Riet, K. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55, 973– 979.

