

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos altamente azucarados

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esperanza Casas Alcantarilla

Directora

María José Valderrama Conde

Madrid, 2003

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE ALTERACIONES
EN ALIMENTOS ALTAMENTE AZUCARADOS

TESIS DOCTORAL

ESPERANZA CASAS ALCANTARILLA

MARZO 1999

23246



BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE ALTERACIONES
EN ALIMENTOS ALTAMENTE AZUCARADOS

Memoria presentada por
ESPERANZA CASAS ALCANTARILLA
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas



X-53-375298-0

Esperanza Casas

Vº Bº la Directora del trabajo

Dra. Mª José Valderrama Conde

MARZO 1999

Este trabajo ha sido financiado gracias a la ayuda recibida de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, y los proyectos AIR CT 93 08030 (europeo) y DGICYT UE 96-0018 (Comunidad de Madrid).

ÍNDICE

	<u>Página</u>
I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.- Levaduras contaminantes de alimentos	2
I.2.- Alimentos altamente azucarados y microorganismos osmotolerantes	4
I.2.1.- Adaptación de las levaduras a altas concentraciones de azúcar	7
I.3.- Los sorbatos como conservantes	10
I.3.1.- Mecanismos de actividad antimicrobiana del sorbato	11
I.3.1.1.- Alteraciones morfológicas	12
I.3.1.2.- Alteraciones en la función metabólica	12
I.3.2.- Resistencia de los microorganismos al sorbato	14
I.3.3.- Aplicaciones del sorbato	19
I.4.- Identificación de levaduras	20
I.4.1.- Esporulación	23
II.- OBJETIVOS DEL TRABAJO	27
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	30
III.1.- Muestras y alteraciones	31
III.2.- Aislamiento de microorganismos	35
III.3.- Mantenimiento de las cepas	38
III.4.- Identificación de levaduras	38
III.4.1.- Esporulación	42
III.5.- Identificación de hongos filamentosos	44
III.5.1.- Identificación de <i>Aspergillus</i>	45
III.5.2.- Identificación de <i>Penicillium</i>	46
III.6.- Reproducción de las alteraciones	48
III.6.1.- Reproducción del olor a "petróleo"	48
III.6.2.- Reproducción de las licuefacciones puntuales	48
III.6.2.1.- Reproducción <i>in situ</i>	48
III.6.2.2.- Reproducción en medios experimentales	48
III.7.- Estudio del mecanismo de licuefacción	49

III.8.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del ácido sórbico	50
III.9.- Caracterización del compuesto responsable del olor a "petróleo"	51
III.9.1.- Identificación de 1,3-pentadieno	51
III.9.2.- Cuantificación de la producción de pentadieno a partir de sorbato ..	53
III.9.2.1.- Cuantificación de sorbato en los medios	54
III.9.2.1.1.- Extracción y preparación de las muestras	54
III.9.2.1.2.- Condiciones de HPLC	55
III.9.2.1.3.- Cuantificación de sorbato	56
III.9.2.1.4.- Estudio de recuperación	56
III.9.2.2.- Cuantificación de pentadieno en los medios	56
III.9.2.3.- Determinación de biomasa	58
III.10.- Prueba estandarizada para la reproducción del olor a "petróleo"	58
IV.- RESULTADOS	60
IV.1.- Microorganismos aislados e identificación	61
IV.1.1.- Levaduras	61
IV.1.2.- Hongos filamentosos	76
IV.2.- Esporulación en cepas representativas	86
IV.3.- Reproducción de las alteraciones	90
IV.3.1.- Reproducción del olor a "petróleo" y/o gas	90
IV.3.2.- Reproducción de las licuefacciones puntuales	93
IV.3.2.1.- Reproducción <i>in situ</i>	94
IV.3.2.2.- Reproducción en medios experimentales	94
IV.4.- CMI de ácido sórbico para cepas seleccionadas	97
IV.5.- Identificación del compuesto responsable del olor a "petróleo"	97
IV.6.- Cuantificación de pentadieno producido a partir de sorbato	105
IV.6.1.- Cuantificación de sorbato	105
IV.6.1.1.- Recuperación de sorbato en los medios sin inocular	106
IV.6.1.2.- Determinación de sorbato en los medios inoculados	108
IV.6.2.- Cuantificación de pentadieno	110
IV.6.3.- Recuentos celulares	112

V.- DISCUSIÓN	114
V.1.- Caracterización de microorganismos aislados	115
V.1.1.- Levaduras	115
V.1.2.- Hongos filamentosos	127
V.2.- Esporulación	131
V.3.- Reproducción de las alteraciones	138
V.3.1.- Reproducción del olor a "petróleo" y/o gas	138
V.3.2.- Reproducción de las licuefacciones puntuales	143
V.4.- CMI de ácido sórbico para cepas seleccionadas	146
V.5.- Identificación de pentadieno como compuesto responsable del olor a "petróleo"	148
V.5.1.- Cuantificación de sorbato	155
V.5.2.- Producción de pentadieno	156
V.5.3.- Recuentos celulares	157
V.6.- Prueba estandarizada	159
 VI.- CONCLUSIONES	 160
 VII.- BIBLIOGRAFÍA	 163
 VIII.- APÉNDICES	 178
Apéndice I.- Medios de cultivo	179
Apéndice II.- Nombres actuales de levaduras	188

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- Levaduras contaminantes de alimentos

Aunque las levaduras son conocidas fundamentalmente por sus beneficios, tales como la tradicional aplicación en la fabricación del vino, la cerveza o el pan, su papel como agentes responsables del deterioro en alimentos ofrece en la actualidad un amplio campo de estudio. Las levaduras son capaces de crecer en un variado conjunto de alimentos bajo determinadas condiciones, lo que puede llegar a suponer importantes pérdidas económicas en ciertos sectores industriales. Entre estas condiciones que favorecen -e incluso seleccionan- el crecimiento de las levaduras, destacan cuatro factores que pueden actuar de forma sinérgica: baja actividad de agua (a_w) -es decir, cantidad de agua del alimento disponible para la actividad metabólica de los microorganismos-, bajo pH, bajas temperaturas y la presencia, normalmente por adición, de agentes antibacterianos (Tudor y Board, 1993). De esta forma, aquellos alimentos que posean una o más de estas características serán susceptibles de contaminación y deterioro por levaduras.

Así, se conocen alteraciones debidas a levaduras contaminantes en alimentos como zumos de frutas y refrescos, bebidas alcohólicas, alimentos altamente azucarados, verduras, alimentos fermentados o conservados en ácido, productos lácteos y de panadería, o carnes y pescados (Fleet, 1992; Deak y Beuchat, 1996). Las principales especies de levadura asociadas con el deterioro de estos productos se especifican en la Tabla 1.

Respecto a la alteración producida por levaduras, una primera manifestación puede ser la formación de biomasa, que es especialmente evidente cuando la levadura es pigmentada, como es el caso de *Rhodotorula spp.*; en líquidos, la aparición de biomasa se detecta por la aparición de turbidez. Cuando la presencia de biomasa queda enmascarada por el propio alimento, la alteración puede deberse a los productos del metabolismo de las levaduras; entre éstos, cabe destacar la formación de gas $-CO_2-$, que distorsiona la forma de los envases y/o los propios productos, y la aparición de diversos olores y sabores de fondo, provocados por la formación de alcoholes, ácidos orgánicos y ésteres (Fleet, 1992; Tudor y Board, 1993).

Tabla 1.- Principales especies de levaduras responsables de deterioro, por orden alfabético, y alimentos de los que se han aislado

Especie de levadura	Alimentos alterados
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Salmueras, carnes fermentadas y curadas, zumo de naranja, leche, helado, nata, queso, yogur, pan, marisco
<i>Dekkera intermedia</i>	Cerveza, vino, refrescos, yogur
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Leche, queso, yogur, salsa de tomate
<i>Kloeckera apiculata</i>	Tomates, higos, cerezas en lata, yogur
<i>Pichia membranifaciens</i>	Salmuera de aceitunas, conservas en vinagre, salsa de tomate, queso, carnes
<i>Rhodotorula spp.</i>	Frutas tratadas térmicamente, nata, mantequilla, helado, yogur, pan, carnes, marisco
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Refrescos, zumos de frutas, queso, yogur, pan
<i>Saccharomyces exiguus</i>	Refrescos, carnes, marisco, chucrut
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Jarabes de azúcar
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Zumos concentrados y jarabes de fruta, vino, salsa de tomate, mayonesa, pan
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Jarabes concentrados, zumos de fruta, rellenos de pastelería, mazapán, ciruelas e higos, mayonesa, marisco

Modificado de Tudor y Board (1993).

I.2.- Alimentos altamente azucarados y microorganismos osmotolerantes

Los productos altamente azucarados se incluyen dentro de un amplio grupo de alimentos que se denominan de humedad intermedia, conocidos por sus siglas en inglés como **IMF's** (*Intermediate Moisture Foods*) (Tilbury, 1976; Deak y Beuchat, 1996). Se consideran alimentos de humedad intermedia a aquéllos que poseen un contenido en agua entre 15 y 20% y una a_w con valores entre 0,60 y 0,85. Este término engloba a muchos alimentos sometidos a la adición de azúcar o sal, secado o curado, tratamientos que conducen a una mejor conservación de los productos, debido al hecho bien conocido de que disminuyendo la a_w mediante secado o adición de solutos, se puede retardar e incluso inhibir el crecimiento microbiano. La Tabla 2 muestra algunos grupos de alimentos azucarados incluidos como alimentos de humedad intermedia atendiendo a las características de humedad y a_w previamente descritas.

Tabla 2.- Principales productos azucarados de humedad intermedia, junto con su humedad y su actividad de agua

Tipo de producto	Ejemplos	Humedad (% p/p)	Actividad de agua (a_w)
Azúcares, jarabes, conservas	Azúcar sin refinar	0,4-0,7	0,60-0,75
	Jarabes de azúcares; azúcar invertido	20-36	0,70-0,86
	Miel, compota, mermelada	20-35	0,63-0,80
Concentrados de zumos de frutas	Zumo de frambuesa	35	0,79-0,80
	Zumo de naranja	35	0,80-0,84
	Zumo de manzana	-	0,71-0,75
Productos de confitería y repostería	Caramelos y <i>toffees</i>	8	0,60-0,65
	Mazapán	15-17	0,67-0,80
	Cerezas glaseadas	30	0,75
	Pasteles de frutas	20-28	0,73-0,83
Chocolate	Relleno de chocolate	-	0,64
Frutas desecadas	Ciruelas, higos	20	0,68
	Dátiles	12-25	0,60-0,65

- = datos no especificados.

Modificado de Tilbury (1976), Jermini *et al.* (1987) y Tudor y Board (1993).

En relación con los valores consignados en esta tabla, se deduce que en los alimentos de humedad intermedia no es posible, en términos generales, el crecimiento bacteriano, ya que éste se inhibe cuando la a_w se encuentra por debajo de 0,85 (Tilbury, 1976; ICMSF, 1991). Asimismo, la mayoría de levaduras y mohos son también inhibidos a estos valores de a_w , pero algunas especies pueden tolerar altas concentraciones de solutos (El Halouat y Debevere, 1997).

Las levaduras resistentes a elevadas concentraciones de azúcar se denominan, en general, **levaduras osmotolerantes**. Para su definición, se han utilizado diversos términos como "osmofílicas", "osmotofílicas", "osmotolerantes", "osmotodúricas", "osmotróficas", "xerofílicas" o "xerotolerantes" (Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987; Deak y Beuchat, 1996). Sin embargo, el término "levadura osmofílica" se considera impreciso según algunos autores, ya que estas cepas no requieren necesariamente para su supervivencia una baja a_w , y la presión osmótica no es un factor fisiológico de estas levaduras (Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987; Deak y Beuchat, 1996). Así, y aunque el término "xerotolerantes" propuesto por Anand y Brown en 1968 se considera el más adecuado, la denominación más frecuente es la de levaduras osmotolerantes, reservándose el término xerotolerantes para especies de hongos filamentosos capaces de crecer a baja a_w .

De igual forma, se han propuesto diferentes clasificaciones de acuerdo con la tolerancia a distintas concentraciones de azúcar. Por ejemplo, Windisch *et al.* (1978a) establecen las siguientes categorías: levaduras osmotolerantes, si crecen en 2 ó 40% (p/v) de glucosa; no osmotolerantes si crecen sólo en 2% (p/v) de glucosa; y osmofílicas si crecen en 60% (p/v) de azúcar. Recientemente, Taing ok y Hashinaga (1997) diferencian tres tipos de levaduras de acuerdo con la tolerancia a distintas concentraciones de azúcar: de tolerancia fuerte, si no crecen bien en YMA (*Yeast Morphology Agar*, con 1% de glucosa, ver Apéndice I) y su crecimiento es máximo en 30 ó 40% (p/p) de glucosa; de tolerancia moderada, si crecen bien en YMA así como en 10 ó 20% de glucosa; y de tolerancia débil, si su crecimiento máximo es en YMA o en concentraciones de glucosa menores del 10%, y el crecimiento disminuye a medida que se incrementa la concentración de azúcar.

El problema fundamental de la contaminación por levaduras osmotolerantes de los productos altamente azucarados no es sanitario, ya que entre éstas no se encuentran especies patógenas, sino que consiste en el **deterioro** de los mismos (Tilbury, 1976); así, se han descrito alteraciones en alimentos como miel, zumos de frutas concentrados, melazas, jarabes, mermeladas, productos de repostería, etc. (Golden y Beuchat, 1990; Deak y Beuchat, 1996; Taing ok y Hashinaga, 1997). De hecho, las levaduras causan con frecuencia grandes pérdidas económicas en las industrias productoras de estos alimentos. La fermentación de los productos ricos en azúcar es la causa más común del deterioro (Tudor y Board, 1993). Los productos que han sufrido este tipo de deterioro adquieren turbidez (si son líquidos) y el contenido sólido se reduce -efecto que se describirá con detalle en el apartado de Discusión-, apareciendo además un intenso aroma alcohólico; si el producto está contenido en algún recipiente herméticamente cerrado, éste se hinchará debido a la producción de CO₂ (Jermini *et al.*, 1987; Fleet, 1992; El Halouat y Debevere, 1996). En estos alimentos, pueden desarrollarse poblaciones de levaduras de hasta 10⁶-10⁹ células/g (Fleet, 1992). Ingram, ya en 1957, estableció que cualquier sustrato rico en azúcar invariablemente enriquece levaduras osmotolerantes a menos que se mantengan condiciones de higiene muy estrictas (Tudor y Board, 1993). En la industria, además de estas condiciones de higiene, deben adoptarse controles de rutina tanto para materias primas como durante el procesado del alimento, para detectar la contaminación cuando ésta se encuentra todavía en bajos niveles y evitar así el deterioro final de los productos (Jermini *et al.*, 1987).

La mayoría de las levaduras osmotolerantes implicadas en el deterioro de productos azucarados (a_w entre 0,80 y 0,85) pertenecen al género *Zygosaccharomyces* (Tokuoka e Ishitani, 1991; Deak y Beuchat, 1996; El Halouat y Debevere, 1997). De entre ellas, la más frecuentemente aislada es *Zygosaccharomyces rouxii*, conocida por su tolerancia a elevadas concentraciones de solutos, principalmente azúcares, aunque también NaCl (Onishi, 1963; Restaino *et al.*, 1983; Golden y Beuchat, 1990; Fleet, 1992; Tudor y Board, 1993; El Halouat y Debevere, 1996; Praphailong y Fleet, 1997). Algunas cepas del género *Zygosaccharomyces* toleran una a_w de 0,65 (Tokuoka e Ishitani, 1991); cuando otras condiciones extrínsecas son óptimas, *Z. rouxii* puede crecer a un valor de a_w de 0,62 (Restaino *et al.*, 1983; ICMSF, 1991; Tokuoka e Ishitani, 1991), aunque la a_w óptima para

su crecimiento es de 0,95 (Deak y Beuchat, 1996). Otras especies de *Zygosaccharomyces* son menos osmotolerantes y se aíslan con menor frecuencia de alimentos azucarados. En la Tabla 3 se han recogido además otras levaduras aisladas de este tipo de productos.

Tabla 3.- Principales levaduras osmotolerantes asociadas con el deterioro de alimentos altamente azucarados

Levadura	MCG* (% p/p)	Alimento
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	60	Miel, jarabes, zumos concentrados, melazas, pasas; azúcar, mazapán, confitería
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	50	Concentrados de frutas, melazas, frutas desecadas
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	50	Mermelada, jarabes, azúcar sin refinar, melazas
<i>Candida lactis-condensi</i>	57	Fruta confitada, frutas desecadas, azúcar refinado
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	75	Miel, fruta confitada, azúcar sin refinar, melazas, pasas
<i>Debaryomyces hansenii</i>	50	Mermelada, jarabe, azúcar sin refinar, confitería
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	50	Miel, bombones, melazas, fruta desecada
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	50	Pasas, azúcar de caña, melazas
<i>Pichia anomala</i>	50	Mermelada, pasas, frutas desecadas, confitería, melazas

* Máxima concentración de glucosa tolerada para el crecimiento.

Adaptado de Tilbury (1976), Rose y Harrison (1993) y Deak y Beuchat (1996).

I.2.1- Adaptación de las levaduras a altas concentraciones de azúcar

Las elevadas concentraciones de solutos en el medio conducen a la plasmolisis celular, recesión de la membrana citoplasmática respecto de la pared celular, y una posible

reducción en el tamaño de poro (Golden y Beuchat, 1992a). Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, la exposición a condiciones hiperosmóticas provoca una rápida reducción en el volumen interno celular debido al eflujo de agua (Myers *et al.*, 1977), así como un incremento en el grosor de la pared celular y la formación de proyecciones irregulares de la membrana hacia el citoplasma, cambios que revierten al ser cultivadas las células en medio líquido con mayor a_w (Golden y Beuchat, 1992a).

Las levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcar presentan una serie de propiedades fisiológicas que les permiten la adaptación y supervivencia en tales condiciones de a_w reducida. La fundamental es su capacidad de acumular en su interior alcoholes polihídricos (**polioles**) como arabitol, manitol, arabinitol o glicerol (Fleet, 1992; Deak y Beuchat, 1996; Myers *et al.*, 1997; Praphailong y Fleet, 1997). Estos polioles están implicados en la osmorregulación, y funcionan como **solutos compatibles**, es decir, sustancias que, acumuladas en niveles altos, protegen a las enzimas intracelulares frente a la inhibición e inactivación provocados por el estrés o el choque osmóticos (Brown y Simpson, 1972). Al compensar la diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana, la capacidad metabólica de estas levaduras no es afectada (Myers *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* también produce elevadas concentraciones de glicerol en respuesta a entornos de baja a_w , pero es incapaz de retenerlo intracelularmente, y se acumula en el medio extracelular. El proceso es energéticamente desfavorable, restringiendo la capacidad de esta especie para tolerar entornos de muy baja a_w , por lo que en general no se la considera osmotolerante (Fleet, 1992).

Las levaduras osmotolerantes, sin embargo, son capaces de sintetizar y retener glicerol, incluso algunas poseen bombas para la captación activa de glicerol del medio (Myers *et al.*, 1997). Esta concentración intracelular de glicerol parece estar regulada por la a_w externa mediante una ATPasa de membrana (Deak y Beuchat, 1996). La acumulación de este polialcohol puede ser afectada por el tipo de soluto que provoca el descenso de a_w (Golden y Beuchat, 1992a), como sucede con la producción de otro poliol, el D-arabitol, por parte de *Z. rouxii*, que es favorecida por elevadas concentraciones de glucosa pero no de sacarosa (Golden y Beuchat, 1990; Tokuoka e Ishitani, 1991); esta **especificidad** de soluto será mencionada de nuevo más adelante. La capacidad de producción de polioles por

Z. rouxii y otras levaduras osmotolerantes puede ser aprovechada industrialmente para la obtención de glicerol, arabitol o eritritol (Windisch, 1969; Taing ok y Hashinaga, 1997).

Otros factores implicados en la resistencia a elevadas concentraciones de soluto son la composición alterada de la pared y membrana celulares (Praphailong *et al.*, 1997). Puesto que los polioles atraviesan con facilidad las membranas biológicas, en presencia de baja a_w deben existir variaciones estructurales y/o funcionales en la mismas que les confiera menor permeabilidad al glicerol (Hocking, 1993). Un posible mecanismo es un cambio en la composición de los fosfolípidos de la membrana, concretamente del grado de insaturación de los ácidos grasos, ya que a medida que aumenta este grado de insaturación aumenta también la fluidez de la membrana, y por tanto su permeabilidad. Por otra parte, la composición en esteroides también influye notablemente en la permeabilidad de la membrana, de manera que la incorporación de colesterol en las membranas las convierte en menos permeables a pequeñas moléculas orgánicas como son los polioles. Aquellos cambios en la composición de la membrana que disminuyan la fluidez y permeabilidad de la misma podrían por tanto facilitar la acumulación intracelular de polioles en los microorganismos osmotolerantes (Hocking, 1993).

Restaino *et al.* (1983) sostienen que la a_w óptima para una levadura osmotolerante está fuertemente influida por el **preacondicionamiento**, es decir, la exposición previa y continuada a elevadas concentraciones de azúcar. En este sentido, Tokuoka e Ishitani (1991) y Deak y Beuchat (1996) también afirman que la adaptación al entorno afecta a la osmotolerancia de las células de levadura, pues tras la preincubación en presencia de elevadas concentraciones de un azúcar, las levaduras son capaces de crecer posteriormente en medios con menor a_w , es decir, con mayor concentración de este mismo azúcar. Por tanto, cabe de nuevo hacer mención a la especificidad de soluto, no sólo en el preacondicionamiento, sino también en la supervivencia de las levaduras en medios con muy baja a_w . Así, Tokuoka e Ishitani (1991) encuentran que las células de levaduras de diferentes especies sobrevivían incluso por debajo de la a_w mínima para el crecimiento cuando el medio contenía sacarosa, aunque morían si tenía glucosa o fructosa; asimismo, la acción de la sacarosa disminuía la a_w mínima para el crecimiento tanto en cepas que asimilaban la sacarosa como en las que no.

I.3.- Los sorbatos como conservantes

El ácido sórbico o ácido 2,4-hexadienoico ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$) se incluye dentro de un conjunto de compuestos ampliamente utilizados como antimicrobianos, cuyas características comunes comprenden el ser ácidos débiles, de cadena corta y lipofílicos (Sofos, 1989). Además del ácido sórbico, se encuentran otros ácidos como el benzoico, el acético y el propiónico, entre otros, junto con sus sales. Las sales sódica, potásica y cálcica son mucho más solubles que la forma ácida, prácticamente insoluble en agua (Liewen y Marth, 1985a; Sofos y Busta, 1993; Deak y Beuchat, 1996).

El ácido sórbico y sus sales, conocidos como **sorbatos**, se consideran fungistáticos porque son eficaces principalmente frente a mohos y levaduras; la acción inhibitoria de los sorbatos frente a bacterias es menos intensa, afecta a un menor número de especies y sus mecanismos están menos estudiados (Sofos, 1989).

Los ácidos débiles poseen la capacidad de penetrar en su forma protonada a través de la membrana celular; una vez en el citoplasma, que posee un pH cercano a la neutralidad, se disocian, y la liberación de protones provoca una acidificación intracelular (Warth, 1989; Cheng y Piper, 1994; Neves *et al.*, 1994; Deak y Beuchat, 1996). Esta acidificación intracelular es probablemente el aspecto más significativo de la actividad antimicrobiana de estos compuestos, ya que conduciría a la detención del crecimiento (Cole y Keenan, 1987; Neves *et al.*, 1994; Holyoak *et al.*, 1996).

La actividad antimicrobiana del sorbato depende pues de la presencia del ácido sin disociar (Skirdal y Eklund, 1993; Wind y Restaino, 1995; Deak y Beuchat, 1996; Malfeito Ferreira *et al.*, 1997a), forma capaz de atravesar la membrana plasmática. Una vez en el citosol, la disociación requiere que el pH intracelular sea superior al externo, de ahí que la acción del ácido sórbico sea dependiente del pH del medio (Liewen y Marth, 1985a; Sofos, 1989; Kinderlerer y Hatton, 1990; Deak *et al.*, 1992). Tanto la penetración del ácido en la célula como la inhibición del crecimiento aumentan con la acidificación del medio (Tilbury, 1976; Sofos, 1989; Cheng y Piper, 1994; Praphailong y Fleet, 1996), según el pH

se aproxima a la constante de disociación del ácido: $pK_a = \text{pH } 4,76$, valor al cual el 50% del ácido sórbico está en su forma sin disociar (Liewen y Marth, 1985a; Sofos, 1989). A pH muy bajo, se necesitan concentraciones muy bajas de sorbato para inhibir a los microorganismos. Según refieren Liewen y Marth (1985a), el límite superior de pH para la actividad antimicrobiana del sorbato es de 6,0-6,5.

A pesar de que se considera que el efecto antimicrobiano del sorbato depende de la molécula sin disociar, la forma aniónica puede contribuir hasta cierto grado a la inhibición (Neves *et al.*, 1994; Deak y Beuchat, 1996; El Halouat y Debevere, 1996). Eklund (1983), mediante un modelo matemático, concluyó que el ácido disociado tenía efecto inhibitorio, aunque 10-600 veces menor que el de la forma sin disociar, y Sofos y Busta (1993) calculan, para el sorbato potásico, un potencial antimicrobiano del 74% respecto al ácido sórbico; a valores de pH por encima de 6,0, más del 50% de la inhibición del crecimiento correspondería a la forma disociada. En *Candida valida*, aproximadamente la misma concentración de ácido sórbico sin disociar, junto con una elevada proporción de anión sorbato, era más inhibitoria que el ácido sórbico presente principalmente en su forma sin disociar (Deak *et al.*, 1992). También se ha demostrado actividad antimicrobiana de la forma disociada, dependiendo del microorganismo, en *Candida albicans*, y en ciertas especies de bacterias -*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*- y de mohos -*Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Ulocladium atrum*- (Skirdal y Eklund, 1993).

A valores de pH por encima de 6,0, la acidificación en el interior celular no puede explicar la inhibición del crecimiento, por lo que debe estar implicado más de un mecanismo de inhibición (Liewen y Marth, 1985a; Sofos, 1989).

I.3.1.- Mecanismos de actividad antimicrobiana del sorbato

No se conocen con certeza los mecanismos implicados en la inhibición del crecimiento provocada por los ácidos débiles, y se considera que debe haber más de uno. Algunos efectos serán debidos a la acidificación del citoplasma, que interfiere con procesos metabólicos, y otros se relacionarán con las propiedades estructurales de los conservantes.

El mecanismo global de inhibición puede además diferir en bacterias, mohos y levaduras (Liewen y Marth, 1985a). Así, el efecto inhibitorio del sorbato sobre las bacterias parece residir en la prolongación de la fase de latencia por retraso en el comienzo de la fase de crecimiento logarítmico, sin influencia apreciable sobre la tasa de crecimiento (Sofos, 1989). En mohos, y especialmente en levaduras, los efectos del sorbato estudiados, revisados por Liewen y Marth (1985a), Sofos (1989), Sofos y Busta (1993) y Deak y Beuchat (1996) son los siguientes:

I.3.1.1- Alteraciones morfológicas, como variaciones en el tamaño y forma celulares, aparición de núcleos irregulares, y mitocondrias desorganizadas en mayor número y de distintos tamaños (Kinderlerer y Hatton, 1990; Golden y Beuchat, 1992a).

I.3.1.2.- Alteraciones en la función metabólica

A) *Inhibición de sistemas enzimáticos*, fundamentalmente los implicados en el metabolismo de la fuente de carbono (Kinderlerer y Hatton, 1990; Golden y Beuchat, 1992a; Burlini *et al.*, 1993; Cheng y Piper, 1994).

El ácido sórbico también podría desacoplar la fosforilación oxidativa en la mitocondria, inhibiendo enzimas celulares (Kinderlerer y Hatton, 1990).

B) *Función de transporte*, inhibiendo el transporte de sustratos a través de la membrana celular -azúcares, aminoácidos, etc.- y el transporte electrónico en la mitocondria (Kinderlerer y Hatton, 1990; Warth, 1991a; Golden y Beuchat, 1992a), lo que detendría el crecimiento celular.

Esta inhibición del transporte podría afectar directamente a enzimas de transporte (por ejemplo aminoácido permeasas), o ser consecuencia de otros fenómenos:

- Disminución en los niveles de ATP, debido a que la bomba Na^+/H^+ , que se activa cuando el ácido sórbico se disocia en el interior celular para intentar mantener el pH interno, funciona a expensas de la hidrólisis de ATP (Sofos, 1989; Warth, 1991a y b). La

disminución en los niveles de ATP sería responsable de la inhibición en la captación de nutrientes. Sin embargo, Burlini *et al.* (1993) no encuentran descenso en los niveles de ATP tras la preincubación de *S. cerevisiae* en presencia de sorbato y benzoato.

- Neutralización de la fuerza protomotriz (FPM), necesaria para el transporte activo de compuestos como aminoácidos y cetoácidos. De los dos componentes de la PMF, el gradiente de protones transmembrana (ΔpH) y el potencial eléctrico ($\Delta\phi$), la disociación de los ácidos débiles en el citosol provoca la disipación del primero (Eklund, 1980, 1985; Ronning y Frank, 1987; Stratford y Anslow, 1996).

Según Eklund (1980, 1985), el paso limitante en la liberación de protones en el interior de la célula es la velocidad a la que el ácido disociado, cargado negativamente, sale al exterior para captar otro protón del entorno de bajo pH y transportarlo al interior celular, disminuyendo el pH interno y disipando la FPM de la membrana. El ácido sin disociar actuaría como un **protonóforo** (Ronning y Frank, 1987). Debido a que Eklund encontró inhibición a pH neutro, se ha concluido que la inhibición tiene dos componentes, un efecto inhibitorio específico de la forma sin disociar sobre la función metabólica debido a su estructura (mediante interacciones, enlaces covalentes, etc.), y otro más general debido a la acidificación del citoplasma (Sofos, 1989).

Por último, Ronning y Frank (1987) concluyeron que la actividad como protonóforo del ácido sórbico inducía en bacterias una respuesta reguladora tipo "astringente" (*stryngent response*) responsable de la inhibición del crecimiento; la concentración limitante de uno o más aminoácidos origina el cese de la replicación celular aunque la célula permanece viable, estado que revierte cuando la cantidad de aminoácidos deja de ser limitante. Confirmada la idea de que el ácido sórbico actúa sobre la membrana y bloquea la captación de aminoácidos (Eklund, 1983) por alteración en la FPM por la actividad protonófora del ácido sórbico, se producirá una "respuesta astringente" expresada como inhibición del crecimiento. Como este sistema de regulación afecta a diversas rutas metabólicas, el mecanismo de la respuesta astringente explicaría la inhibición por sorbato de numerosos sistemas enzimáticos (Sofos, 1989).

I.3.2.- Resistencia de los microorganismos al sorbato

A pesar de la presencia de conservantes, la preservación de los alimentos no está garantizada. En primer lugar, son generalmente inefectivos cuando los niveles de microorganismos contaminantes son elevados (Kinderlerer y Hatton, 1990); en segundo lugar, existen microorganismos **resistentes** a los niveles máximos permitidos de estos conservantes (Tilbury, 1976; Holyoak *et al.*, 1996), incluso capaces de metabolizarlos como fuente de carbono (Liewen y Marth, 1985a; Kinderlerer y Hatton, 1990). En este apartado, aunque se refiere específicamente al sorbato, hay que mencionar que los mecanismos generales de resistencia se consideran comunes para el grupo de ácidos débiles de cadena corta.

La sensibilidad a la inhibición por sorbato es variable dependiendo de la cepa y especie de microorganismo. Entre bacterias, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Streptococcus* spp. son más resistentes a la inhibición que otras especies bacterianas como *E. coli*, *Aerobacter aerogenes* y *Clostridium perfringens*. En general, *S. aureus* es más resistente al sorbato que otras bacterias, mientras que *Clostridium botulinum* es fuertemente inhibida (Sofos, 1989).

Por su parte, algunos hongos pertenecientes al género *Penicillium* son también extraordinariamente resistentes al sorbato ya que, como sucede dentro de las bacterias lácticas, son capaces de degradar el sorbato (Skirdal y Eklund, 1993), a través de ciertos mecanismos que serán descritos en el Apartado V.5 de Discusión.

La adaptación a los conservantes parece ser común en las especies de levadura (Warth, 1988; Piper *et al.*, 1995). En general, las levaduras más resistentes a los conservantes son, además, osmotolerantes (Deak y Beuchat, 1996); así, hay especies del género *Zygosaccharomyces* conocidas por su resistencia a concentraciones relativamente elevadas de ácidos débiles de cadena corta empleados como conservantes, que incluyen al ácido sórbico (Cole y Keenan, 1987; Neves *et al.*, 1994). Entre dichas especies, cabe destacar a *Z. bailii* (Warth, 1977; Deak *et al.*, 1992; Holyoak *et al.*, 1996) y *Z. rouxii* (Bills

et al., 1982; Restaino *et al.*, 1982 y 1983; Golden y Beuchat, 1992a y b); esta última, debido además a su tolerancia a concentraciones extremadamente elevadas de azúcar y sal, supone un importante riesgo para la conservación de los alimentos de humedad intermedia (Golden y Beuchat, 1990, 1992a y b).

Otras levaduras conocidas por su resistencia al sorbato son la especie *Issatchenkia orientalis* y algunas cepas pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida* o *Trigonopsis* (Sofos, 1989; Deak *et al.*, 1992; Fleet, 1992; Sofos y Busta, 1993). Sin embargo, es importante mencionar que existe una considerable variabilidad en la resistencia de cepas individuales a estos ácidos débiles (Kinderlerer y Hatton, 1990).

Un factor fundamental en la resistencia al sorbato es la exposición previa y repetida al sorbato o **preacondicionamiento** (Sofos, 1989; Deak *et al.*, 1992; Sofos y Busta, 1993; Deak y Beuchat, 1996). Según Warth (1988), el fenómeno de la adaptación celular se manifiesta por un incremento en la tolerancia a un agente antimicrobiano debido al crecimiento previo en su presencia, permitiendo de esta forma a las levaduras crecer en presencia de concentraciones crecientes de ácido sórbico.

La máxima concentración de conservante que una levadura puede tolerar puede estar determinada por la velocidad con la que la molécula entra en la célula y la capacidad de la célula para eliminarlo. Las levaduras resistentes al sorbato poseen generalmente una tasa más baja de captación de conservantes, por lo que la permeabilidad de la membrana a los mismos, debido a diferencias en la composición de ácidos grasos, puede estar implicada en la tolerancia (Deak y Beuchat, 1996).

Si los ácidos débiles penetran en la célula desde un entorno extracelular más ácido y se disocian en el citoplasma, la capacidad de las levaduras para tolerar elevadas concentraciones de ácidos débiles implicará ciertos mecanismos que permitan exportar - bombear- los protones y aniones que se acumulan intracelularmente (Praphailong y Fleet, 1997). Uno de estos mecanismos es la inducción de un sistema de transporte que elimine tanto los protones como los aniones para mantener un pH intracelular adecuado (El Halouat y Devere, 1996); esta regulación del pH puede ser el resultado de la modulación de la

síntesis y actividad de la ATPasa responsable del bombeo de protones (Neves *et al.*, 1994; Piper *et al.*, 1995). En el caso del ácido benzoico, Warth (1988) postula que la disminución de la concentración intracelular del anión y el mantenimiento de un pH cercano a la neutralidad requiere un gasto continuo de energía. La mayor parte se invierte en la extrusión de los protones liberados en la disociación intracelular del ácido, mientras que la extrusión del anión probablemente no requiere energía adicional. La energía necesaria para reducir la concentración de conservante y mantener el pH interno no puede ser empleada por tanto para el crecimiento, lo que conlleva una disminución en la tasa de crecimiento de la levadura (Warth, 1988; Neves *et al.*, 1994; El Halouat y Devedere, 1996). La cesación total del crecimiento tiene lugar cuando la capacidad de los sistemas celulares para compensar la entrada de ácido benzoico sin disociar es excedida (Warth, 1988).

El mecanismo de resistencia en *Z. bailii*, descrito por primera vez por Warth en 1977, sería un sistema inducible, que requiere energía obtenida a partir de un sustrato como glucosa (es por tanto un transporte activo), y que "bombea" las moléculas de ácido sin disociar fuera de la célula, manteniendo así elevado el pH intracelular. Este mecanismo de resistencia es un determinante general y el más importante para la tolerancia a conservantes de las levaduras (Warth, 1989). Las células de *Z. bailii*, en ausencia de fuente de energía, acumulan los conservantes intracelularmente, mientras que en presencia de glucosa se reduce el contenido intracelular de los mismos. Así, y de acuerdo con el modelo propuesto por Warth, la respiración aerobia del azúcar podría proporcionar la energía necesaria para bombear el conservante al exterior (Restaino *et al.*, 1983). Asimismo, tanto en *Z. bailii* como en *S. cerevisiae*, las concentraciones subletales de ácido benzoico podrían estimular la tasa de fermentación para que las células obtengan la energía necesaria para bombear los protones y mantener el pH intracelular (Warth, 1991a y b). Por último, se ha postulado que el incremento de la extrusión de protones catalizada por la ATPasa de membrana y el volumen disminuido del protoplasma contribuye indudablemente a mantener el pH interno en las células de *Z. bailii* adaptadas al crecimiento en presencia de ácidos débiles (Cole y Keenan, 1987; Cheng y Piper, 1994).

Cole y Keenan (1987), sin embargo, no encontraron evidencia de extrusión activa de los ácidos débiles. Los valores de pH intracelular, medidos en células de *Z. bailii* que

crecen en presencia de ácido benzoico, fueron de 4,85-5,55, frente al valor normal de 5,8 referido por Warth (1991b). Esto hace pensar a los autores que esta levadura posee la capacidad de tolerar reducciones continuadas de su pH interno. También sugieren, en lugar del sistema de bombeo de conservante descrito por Warth, que las células de *Z. bailii* adaptadas incrementan su capacidad tampón citoplasmática y secretan ácidos orgánicos producidos durante el metabolismo normal.

Por otra parte, Piper *et al.* (1995) encontraron en *S. cerevisiae* dos proteínas de membrana que eran fuertemente inducidas por sorbato: una más pequeña, que se induce también bajo otros tipos de estrés -choque térmico, etanol, privación de nutrientes-, y otra desconocida, similar en tamaño a una proteína de membrana, también inducida por sorbato, que se ha encontrado en *Z. bailii*.

Puesto que el incremento en la actividad de la ATPasa de membrana es energéticamente costoso, casi con seguridad debe haber otros mecanismos, incluso algunos todavía desconocidos, de tolerancia a los ácidos débiles (Piper *et al.*, 1995). Las diferencias en esta tolerancia entre especies se deberían, además de la capacidad para eliminar el conservante y los protones, a diferencias en la tasa de penetración del ácido sin disociar en las células o a una sensibilidad intrínseca característica al conservante o a su anión (Warth, 1988, 1991a; El Halouat y Devere, 1996). Por su parte, Piper *et al.* (1995) deducen de sus experiencias que la proteína de menor tamaño inducida en *S. cerevisiae* en presencia de sorbato actúa como un regulador negativo de la H⁺-ATPasa que provocaría el descenso en la actividad de la misma después de que otros mecanismos de tolerancia a los ácidos débiles se hayan activado.

Se ha descrito que el nivel de a_w del medio puede incrementar o disminuir la tolerancia de las levaduras al sorbato, y aún no existen estudios concluyentes que clarifiquen las observaciones discrepantes (Fleet, 1992). Por una parte, Restaino *et al.* (1982) refieren que, a medida que los niveles de a_w descienden respecto del óptimo para *Z. rouxii* y *Z. bailii*, el ácido sórbico y el benzoico son más efectivos; de la misma manera, Liewen y Marth (1985a) y Sofos (1989) indican que la sal (NaCl) y el azúcar intensifican la acción del sorbato por reducción de la a_w . Por el contrario, Restaino *et al.* (1983),

Golden y Beuchat (1992b) y Deak y Beuchat (1996) describen que *Z. rouxii* puede tolerar concentraciones crecientes de sorbato potásico a niveles de a_w decrecientes.

Esta capacidad de crecer en medios con sorbato depende no sólo de la a_w del sustrato, sino también del tipo de soluto que disminuye la a_w (Golden y Beuchat, 1992b). Así, las células crecidas en un medio con sacarosa toleran mayores concentraciones de sorbato que aquéllas crecidas en glucosa. En presencia de elevadas concentraciones de azúcar, las células poseen componentes de la pared celular y lípidos de la membrana modificados que pueden variar por tanto las características de permeabilidad, influyendo así notablemente en la tolerancia de *Z. rouxii* al sorbato (Golden y Beuchat, 1992a). Para *Z. rouxii* se ha postulado además que, a baja a_w , las células se encogen y el tamaño de poro de la membrana disminuye (Golden y Beuchat, 1992a y b), lo que puede retardar el flujo de sorbato al interior de la célula (Restaino *et al.*, 1983; Sofos, 1989; Sofos y Busta, 1993; Deak y Beuchat, 1996). Este efecto se combinaría con el sistema inducible de transporte activo, bombeando el poco sorbato que entre (Warth, 1977; Sofos, 1989; Sofos y Busta, 1993; Deak y Beuchat, 1996). A valores más altos de a_w , la resistencia de *Z. rouxii* al sorbato podría atribuirse al sistema inducible, que requiere la energía suministrada por la oxidación de la glucosa para bombear el conservante fuera de las células (Bills *et al.*, 1982).

La producción de polioles como solutos compatibles por *Z. rouxii* en medios con a_w disminuida podría también estar involucrada en la resistencia al sorbato, protegiendo a las enzimas de la inhibición o inactivación por algunos agentes antimicrobianos (Restaino *et al.*, 1983; Sofos y Busta, 1993).

No hay información sobre los productos finales secundarios producidos por las levaduras cuando crecen en presencia de conservantes como sorbato o benzoato, aunque en estas condiciones parece que producen cantidades anormalmente elevadas de CO_2 (Fleet, 1992), lo que puede deberse a que la fermentación es estimulada por concentraciones subinhibitorias de los conservantes (Sofos, 1989; Warth, 1989, 1991a y b).

I.3.3.- Aplicaciones

El ácido sórbico y sus sales, fundamentalmente sorbato potásico, se utilizan a nivel industrial como conservantes alimentarios. Sus principales ventajas frente a otros conservantes son su actividad en medios poco ácidos, el carecer prácticamente de sabor y su baja toxicidad (Lueck, 1990; Calvo, 1991). En el organismo, estos compuestos son metabolizados como los demás ácidos grasos, es decir, una vez absorbidos sufren una β -oxidación para rendir CO_2 , H_2O y ácido acético como productos finales, así como cierta cantidad de calorías como cualquier fuente energética (Sofos, 1989).

Los principales grupos de alimentos en los que los sorbatos se aplican como conservantes, especialmente frente a mohos y levaduras, son los productos lácteos, productos de panadería, pastelería y confitería, frutas y verduras, emulsiones grasas (mantequilla, margarina, mayonesa), alimentos azucarados, carnes y pescados y vinos (Finol *et al.*, 1982; Sofos, 1989; Lueck, 1990; Sofos y Busta, 1993).

Los métodos de aplicación incluyen adición directa en la fabricación, vaporización o inmersión del alimento en una solución acuosa, espolvoreado o tratamiento del envase (Sofos y Busta, 1993). Dependiendo del método de aplicación, así como de la naturaleza del alimento, se seleccionará la forma del sorbato a emplear. Para alimentos líquidos (zumos, bebidas refrescantes, jarabes, etc.), o cuando se desea aplicar el conservante en forma de solución para vaporización o inmersión (quesos, frutas desecadas, etc.), se empleará la sal potásica, muy soluble en agua, mientras que la adición directa en la fabricación de alimentos como productos de panadería y confitería o verduras se suele realizar en la forma ácida (Sofos, 1989; Lueck, 1990).

Dependiendo de la legislación de cada país, se establecen unos límites legales máximos; en general, las concentraciones de sorbato empleadas oscilan entre 0,2 y 3 g/L (Liewen y Marth, 1985a; Sofos y Busta, 1993). En España, los límites autorizados para la adición de sorbato en algunos alimentos son los siguientes: 600 mg/L en bebidas refrescantes; hasta 2 g/Kg en repostería, pastelería y galletas; 1-1,5 g/Kg en derivados

cárnicos, 1 g/Kg en quesos, aceitunas en conserva, postres lácteos con frutas, mantequilla, margarina y mermelada; y máximo 0,2 g/L en la industria de fabricación de vino, como inhibidor de la fermentación secundaria (Calvo, 1991).

I.4.- Identificación de levaduras

La identificación de levaduras se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante técnicas microbiológicas convencionales que tienen en cuenta las características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas de las cepas (Kreger van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 1990; Kurtzman, 1994; Deak y Beuchat, 1996; Kurtzman y Fell, 1998). Los procedimientos tradicionales incluyen diversas pruebas para determinar la capacidad de la levadura de fermentar azúcares y asimilar numerosos compuestos carbonados y nitrogenados. Asimismo, estos procedimientos conceden una gran importancia a la morfología celular y el tipo de reproducción sexual. Una vez que se han determinado los caracteres fisiológicos y morfológicos necesarios, la levadura puede identificarse mediante claves basadas en la descripción de especies conocidas (Deak y Beuchat, 1996).

La laboriosidad de los métodos tradicionales ha conducido con posterioridad a formas alternativas simplificadas y más rápidas de los mismos, como son los *kits* comerciales. Éstos presentan, en la mayoría de los casos, el inconveniente de incluir pocas pruebas fisiológicas y bioquímicas, y/o estar orientadas a levaduras de interés clínico, por lo que levaduras relacionadas con la industria alimentaria, tanto beneficiosas como contaminantes, suelen ser identificadas incorrectamente (Barnett *et al.*, 1990; Deak y Beuchat, 1996).

Más recientemente, se ha ensayado la realización de las mismas pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas convencionales empleando placas multipocillo en vez de tubo, con el consiguiente ahorro de medios de cultivo y de tiempo de preparación e inoculación de los mismos (Heard y Fleet, 1990; Deak y Beuchat, 1996).

También se han intentado desarrollar métodos rápidos de identificación, como las técnicas basadas en reacciones enzimáticas empleando sustratos cromogénicos (Deak y

Beuchat, 1996) y el llamado SIM (*Simplified Identification Method*), que es una clave simplificada que recoge las características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas que distinguen a las levaduras más comúnmente asociadas al deterioro de alimentos. El SIM fue desarrollado originalmente por Deak en 1986 y ha sido modificado en sucesivas ocasiones (Deak y Beuchat, 1996).

El análisis bioquímico de determinados componentes celulares posee utilidad en taxonomía y puede ser empleado también como método de identificación de levaduras. Entre otros, cabe citar la quimiotaxonomía basada en la composición en lípidos totales de la célula (Peña y Sandra, 1995; Deak y Beuchat, 1996; Noronha-da-Costa, 1996) y de los polisacáridos de la pared celular y extracelulares (Phaff, 1998; Roelijmans *et al.*, 1998), la identificación de las ubiquinonas (Yamada, 1998) o la comparación electroforética de proteínas y enzimas (Poncet *et al.*, 1992; Deak y Beuchat, 1996; Yamakazi *et al.*, 1998).

Como ejemplo, el análisis de los ácidos grasos mediante Cromatografía de Gases se ha utilizado para diferenciar levaduras que producen deterioro en vinos (Malfeito-Ferreira *et al.*, 1989, 1997b), o para caracterizar levaduras asociadas a la industria cervecera (Oosthuizen *et al.*, 1987; Moreira da Silva *et al.*, 1994) y vinícola (Tredoux *et al.*, 1987a y b). Así, esta técnica puede resultar muy útil por su aplicación industrial para identificación de levaduras (Botha y Kock, 1993); de hecho, se ha comercializado un sistema de identificación de bacterias y levaduras, el MIDI, basado en el perfil de ácidos grasos (Deak y Beuchat, 1996).

Por otra parte, la utilización de técnicas de Genética Molecular en la identificación de levaduras tuvo sus comienzos en el estudio de la complementariedad del ADN nuclear. Algunas cepas definidas como coespecíficas mediante la medida de similitud de ADN mostraban sin embargo diferencias en la fermentación de glucosa, la asimilación de nitrato o la formación de pseudomicelio y micelio verdadero, caracteres fenotípicos fundamentales para los sistemas tradicionales de clasificación. Así, la aplicación de comparaciones moleculares ofrece una novedosa oportunidad de reevaluar esquemas taxonómicos tradicionales desde la perspectiva de las diferencias genéticas cuantitativas. Por ejemplo, el género *Torulopsis* -ausencia de pseudomicelio- se convirtió en sinónimo de *Candida* -

presencia de pseudomicelio-, y *Hansenula* -asimilación de nitrato- se convirtió en sinónimo de *Pichia* -incapacidad de asimilar nitrato- (Kurtzman, 1994).

Actualmente, los métodos moleculares han evolucionado hacia procedimientos que proporcionen un único perfil de ADN de un determinado organismo, lo que se conoce como caracterización de ADN o *DNA fingerprinting*. La utilidad de estas técnicas (Török *et al.*, 1993; Kurtzman, 1998) se ve reforzada por el uso de estrategias como la amplificación del ADN mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), que posibilita la detección de microorganismos en muy bajo número, y el diseño de sondas específicas de ADN (Deak y Beuchat, 1996). La caracterización de ADN se ha utilizado en alimentos, por ejemplo, como complemento a la identificación rutinaria de levaduras contaminantes, para discriminar entre cepas individuales dentro de una misma especie (Baleiras-Couto *et al.*, 1994, 1995, 1997; van der Vossen y Hofstra, 1996).

Una de estas técnicas de caracterización de ADN se basa en el análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con endonucleasas de restricción. El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polimorphism*, RFLP) puede incluso identificar cepas dentro de una misma especie (Barberio *et al.*, 1994), y se ha utilizado para diferenciar cepas individuales de levaduras de panadería, cerveceras y vónicas (Deak y Beuchat, 1996). Comparando los resultados de los patrones de RFLP con los de los de los perfiles de ácidos grasos y el cariotipo -determinación del número y tamaño de los cromosomas-, se concluye que el primero proporciona el método más fiable para caracterizar cepas de levadura vónicas (Deak y Beuchat, 1996).

Una variación del análisis de RFLP es el análisis de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt). Este análisis presenta la ventaja de que, al tratarse de un ADN con un tamaño unas 200 veces menor, se generan menos fragmentos de restricción, por lo que la complejidad del análisis es menor (Deak y Beuchat, 1996). Una de sus aplicaciones en alimentos es el control de las fermentaciones vónicas, ya que permite caracterizar la cepa de *S. cerevisiae* inoculada en forma de "levadura seca activa" y distinguirla de las cepas naturales presentes durante las primeras etapas (Querol *et al.*, 1992a y b). Mediante este

tipo de análisis basados en el polimorfismo a nivel de ADN, tanto nuclear como mitocondrial, se puede seleccionar una cepa de *S. cerevisiae* capaz de producir vinos de alta calidad como resultado de fermentaciones controladas (Querol *et al.*, 1992b y c).

De la misma manera, se ha abordado el estudio de las comparaciones de ARN ribosómico (ARNr) y de su ADN molde (ADNr), mediante análisis de reasociación, RFLP y secuenciación (White *et al.*, 1990; Kurtzman, 1994; Kurtzman y Blanz, 1998). Tales técnicas se han aplicado al estudio sistemático de levaduras pertenecientes a los ascomicetos y basidiomicetos (Kurtzman, 1993; Cai *et al.*, 1996; Kurtzman y Blanz, 1998; Esteve-Zardoso *et al.*, 1999). Como ejemplos de levaduras contaminantes de alimentos en que se han utilizado estos métodos, cabe mencionar los estudios acerca de las interrelaciones entre especies del género *Zygosaccharomyces*, su diferenciación entre sí y con especies muy cercanas filogenéticamente del género *Torulaspota* (James *et al.*, 1994, 1996), *Saccharomyces* (James, 1997) o *Kluyveromyces* (Cai, 1997; Belloch, 1998).

I.4.1.- Esporulación

Dentro de los caracteres morfológicos que se consideran a la hora de identificar levaduras, la observación de esporas sexuales es especialmente importante, en particular cuando la identificación se lleva a cabo mediante una clave dicotómica. Sin embargo, esta observación de esporas sexuales suele ser problemática, ya que existen cepas de levaduras que esporulan con dificultad, incluso en muchas ocasiones no se consigue la detección del estado perfecto aún cuando la levadura haya sido identificada, mediante otros caracteres morfológicos y fisiológicos, dentro de una especie que posee dicho estado. El estado perfecto o **teleomorfo** corresponde a la forma sexual, mientras que se denomina estado imperfecto o **anamorfo** al estado asexual (van der Walt, 1987). Ambos estados, sexual y asexual, reciben diferentes nombres, pero la identificación de una levadura suele hacer referencia al nombre del estado perfecto, que es el que recogen las principales claves de identificación (Davenport, 1981), aún cuando no se hayan observado esporas. En general, la detección del estado sexual y las esporas requiere la observación microscópica de células crecidas en diferentes medios de esporulación durante períodos variables de tiempo (Deak y Beuchat, 1996).

Las levaduras, en función del tipo de estructuras elaboradas que desarrollen para su reproducción sexual, se agrupan en:

- *Ascomicetos*: forman **ascas** como estructuras reproductivas con esporas en su interior.

- *Basidiomicetos*: forman **basidios**, que son estructuras más elaboradas que las ascas, para su reproducción, en los que las esporas son exógenas.

Existe un tercer grupo de levaduras que no poseen reproducción sexual y se denominan **deuteromicetos**.

Las células de levadura que contienen ascosporas se distinguen de las células vegetativas por la presencia de corpúsculos firmes de formas definidas, en un número generalmente entre una y cuatro, y que pueden tener paredes gruesas, lisas, rugosas, etc. y formas diversas (Davenport, 1981; Deak y Beuchat, 1996).

En los ascomicetos, se puede formar el asca en el medio de esporulación por un cambio en la célula vegetativa, o la esporulación puede ser precedida por conjugación de dos células o de una célula con una yema que se fusionan y se convierten en un cigoto donde se produce la fusión nuclear (Kreger-van Rij, 1987; Deak y Beuchat, 1996).

Uno de los factores que controlan la esporulación es la existencia del locus MAT, que en *S. cerevisiae* se encuentra en el cromosoma III, con dos posibles alelos, a y α , lo que determina la existencia a su vez de dos *mating-type*, a y α . La esporulación tiene lugar normalmente en células diploides heterocigóticas de genotipo MAT α /MAT a (Freese *et al.*, 1982; Miller, 1989; Suizu *et al.*, 1995). Cuando es necesaria la conjugación de dos células haploides, cada una debe ser de un *mating-type*.

Si las esporas se forman a partir de una célula haploide tras su diploidización, se dice que la levadura es **homotálica**; cuando es necesaria una combinación de células de distinto *mating-type*, es decir, a y α , para la esporulación, la levadura es **heterotálica** (Kreger-van Rij, 1987; Deak y Beuchat, 1996).

La formación de ascosporas en levaduras es uno de los dos programas de desarrollo que puede seguir la célula (Miller, 1989; Codón *et al.*, 1995), dependiendo de las condiciones del entorno. En condiciones favorables para el desarrollo celular, la gemación es la forma de reproducción más frecuente, pero en condiciones adversas, como el agotamiento del medio y la entrada en fase estacionaria del cultivo, algunas células pueden presentar la capacidad de esporular (Bermejo, 1989). Así, en un medio completo, el núcleo diploide sufrirá una mitosis que precede a la gemación de la célula, mientras que en condiciones de limitación de nutrientes se produce la meiosis (Freese *et al.*, 1982; Miller, 1989; Codón *et al.*, 1995; Suizu *et al.*, 1995), seguida normalmente de la producción de ascosporas. El programa meiótico es en esencia una modificación de un programa mitótico, en que las células siguen inducidas generalmente por la escasez de nutrientes en el medio (Wheals, 1987).

El procedimiento para inducir la esporulación consta de dos etapas: en la primera de ellas se cultiva la levadura en un **medio de preesporulación**, que es un medio rico en fuente de carbono (glucosa) y con suficiente fuente de nitrógeno, para conseguir un crecimiento vegetativo abundante. A continuación, las células se transfieren a un medio pobre en glucosa, el cual constituye el **medio de esporulación** (Bermejo, 1989; Miller, 1989; Codón *et al.*, 1995), ya que en estas condiciones adversas de crecimiento es más probable que las células de levadura esporulen.

Además de la limitación de fuente de carbono metabolizable, en la inducción de la esporulación influyen otros factores como la temperatura de incubación, la presencia de oxígeno o la composición y pH del medio. La formación de ascosporas se favorece con la incubación a 5°C por debajo de la temperatura óptima para el crecimiento vegetativo, como se ha comprobado en *Debaryomyces hansenii* (van der Walt y Yarow, 1984) o *S. cerevisiae* (Codón *et al.*, 1995). Asimismo, la amplia disponibilidad de oxígeno favorece la esporulación, mientras que la elevada presencia de CO₂ la reprime (Bermejo, 1989; Miller, 1989). Además del acetato, conocido inductor de la esporulación, la presencia en el medio de ciertos cationes como Ca⁺⁺, Na⁺ o Mg⁺⁺ estimula la esporulación, mientras que la presencia de amonio o la adición de extracto de levadura la reprimen (Freese *et al.*, 1982; Bermejo, 1989; Miller, 1989). El pH adecuado para la esporulación es cercano a la

neutralidad o alcalino (Bermejo, 1989; Miller, 1989; Suizu *et al.*, 1995). Por último, también se ha indicado (Bermejo, 1989; Codón *et al.*, 1995) que las levaduras esporulan preferentemente en el medio líquido que en los correspondientes medios sólidos de rutina.

A pesar de conocer la influencia general de todos estos factores, cada cepa esporógena es afectada de forma particular, incluso no se llega a observar formación de ascosporas, por lo que no se puede definir un medio óptimo de esporulación.

II.- OBJETIVOS DEL TRABAJO

El presente trabajo forma parte de un Proyecto de Investigación financiado por la Comunidad Europea, titulado "Levaduras contaminantes de alimentos y bebidas: caracterización y ecología para la mejora de su diagnóstico y control" (1993-1996), en el que han participado además diversos grupos de investigación de Portugal, Holanda y Reino Unido. El objetivo fundamental de este Proyecto ha sido la caracterización de las cepas más relevantes de levaduras contaminantes de alimentos y bebidas desde un punto de vista fisiológico, ecológico y molecular, a fin de mejorar su aislamiento diferencial y desarrollar métodos rápidos y sensibles para su detección e identificación. La aplicación de esta tecnología pretende reducir las pérdidas económicas debidas a las levaduras contaminantes en industrias alimentarias, pérdidas que se han incrementado en los últimos años como resultado de la tendencia a disminuir las dosis de conservantes y a la aplicación de tratamientos de conservación menos severos.

La aplicabilidad de los resultados obtenidos se dirige fundamentalmente a industrias productoras de alimentos y bebidas susceptibles de alteración por levaduras. Por ello, varias empresas mostraron apoyo e interés por el Proyecto, convirtiéndose en el llamado "grupo de usuarios", integrado por empresas pertenecientes a los países participantes en el Proyecto. Entre las empresas españolas, ha participado una importante industria española de turrónes y mazapanes, con la cual la colaboración se había iniciado anteriormente a raíz de la aparición de una alteración en algunos de sus productos. Esta alteración consiste básicamente en un olor de fondo definido como a "petróleo", y que provoca el rechazo de los productos por parte de los consumidores. A partir de los productos procedentes de devolución se realizó un estudio microbiológico general que incluía recuentos de mohos, levaduras y varios grupos de bacterias, y uno más detallado que permitió aislar e identificar una levadura como agente responsable de la alteración. Dicho trabajo dio lugar a la Tesina de Licenciatura titulada "Mazapán: microbiología y alteraciones" (1994).

Como continuación de este estudio inicial, y conocida la problemática de las industrias de alimentos azucarados a causa de la presencia de levaduras tolerantes a elevadas concentraciones de azúcar, el trabajo ha continuado, en forma de Tesis Doctoral, en colaboración con esta empresa gracias a la financiación de la CICYT (beca predoctoral). Para la realización de la misma, se ha reunido y analizado un gran número de muestras de productos altamente azucarados. La mayoría han sido suministrados por esta empresa de

turrone y mazapanes, pudiendo disponer de muestras alteradas, muestras sin alterar y materias primas empleadas en su fabricación. También se han recogido muestras de otros productos altamente azucarados, con o sin alteración aparente.

A partir del análisis de estas muestras, los objetivos concretos de la Tesis son:

- **Estudios taxonómicos:** aislamiento e identificación de levaduras y hongos contaminantes y/o causantes de deterioro.

- **Estudios fisiológicos:** investigación de las condiciones en las que se produce el metabolismo que conduce al deterioro, y mecanismos implicados en este último.

- **Estudios físico-químicos:** identificación de los productos de degradación implicados en la alteración.

- **Aplicaciones:** desarrollo de métodos de detección rápida de levaduras potencialmente peligrosas por su capacidad de alterar los alimentos.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- Muestras y alteraciones

La mayoría de las muestras analizadas en este trabajo corresponden a productos elaborados a base de **mazapán**; según la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de turrone y mazapanes (B.O.E. 2 de agosto de 1982), se entiende por mazapán la masa obtenida por amasado, con o sin cocción, de una mezcla de almendras crudas peladas y molidas, con azúcares en sus distintas clases y derivados.

Para la fabricación del mismo, la almendra pelada, blanqueada y picada es dosificada automáticamente y depositada en una mezcladora junto con aproximadamente la misma cantidad de azúcar (sacarosa). Una fórmula típica sería (p/p): almendra 50%, azúcar 38%, azúcar invertido 2%, agua 10%. En esta misma mezcladora se añaden, también dosificados automáticamente, los distintos aditivos, fundamentalmente ácido cítrico como acidulante, en cantidad de acuerdo con Buena Práctica de Fabricación (BPF), y ácido sórbico como conservante, en concentración de 1 g/L, resultando un pH final de aproximadamente 5,5. Tras la mezcla, esta pasta heterogénea pasa consecutivamente por dos refinadoras hasta que adquiere una textura homogénea. Actualmente, la pasta es sometida a un tratamiento térmico, equivalente a una pasterización, mediante inyección directa de vapor en un recipiente cerrado, tras el cual la masa recién calentada se almacena en contenedores y se deja reposar durante 48 horas antes de su manufactura.

Otros ingredientes que intervienen en la composición de algunos productos derivados del mazapán son:

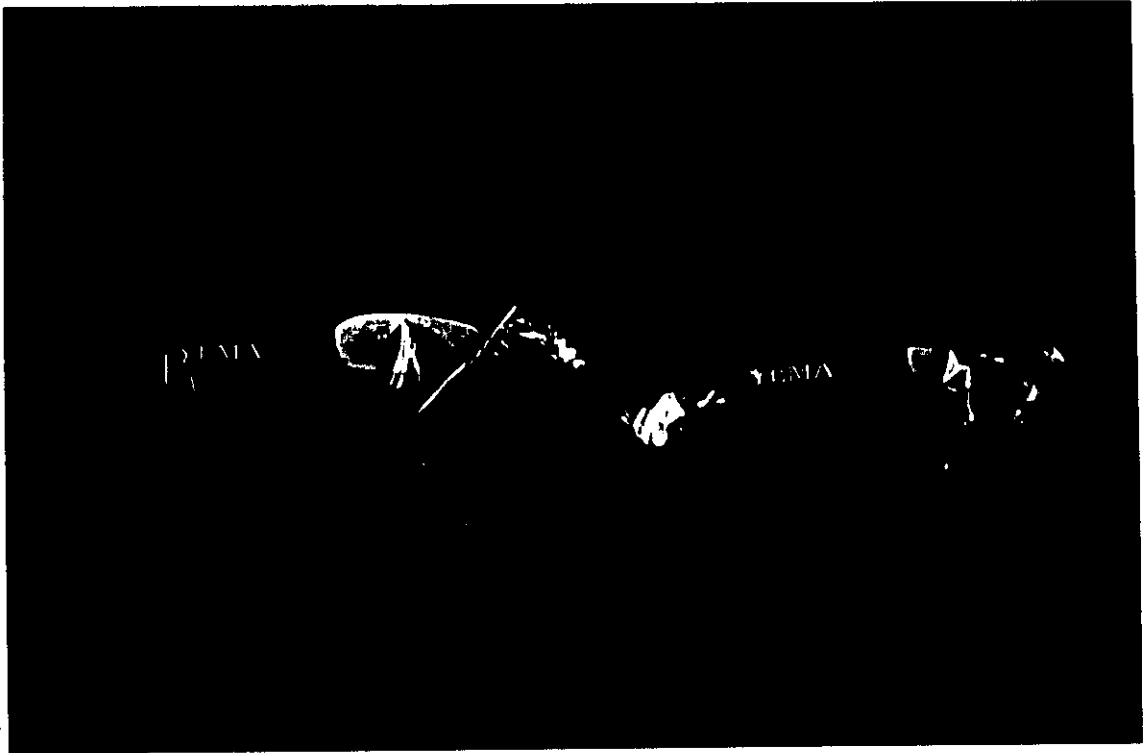
- **Yema confitada**: yema de huevo más azúcar.
- **Boniato confitado**: boniato más azúcar.
- **Fruta confitada**: frutas variadas cocidas en jarabe de glucosa.
- **Azúcar invertido**: mezcla equimolecular de glucosa y fructosa (Ranken, 1993). Se puede sustituir por **jarabe de glucosa**, obtenido por hidrólisis enzimática del almidón de maíz, cuya composición, en % en peso seco, es la siguiente: glucosa, 28%; maltosa, 29%; fructosa, 9%; maltotriosa, 14%; otros polisacáridos, 20%.

A partir de estos ingredientes se fabrican distintas variedades de mazapán. Las analizadas en este trabajo han sido las siguientes:

- **Figuritas de mazapán:** masa de mazapán troquelada y horneada.
- **Pan de Cádiz:** Masa de mazapán horneada en forma de pan, con tres capas interiores de relleno, alternando boniato y yema confitados.
- **Pasteles de yema:** masa de mazapán en forma de huevo, con relleno de yema confitada, y horneado ligero.
- **Pasteles de gloria:** como los pasteles de yema pero con relleno de boniato confitado.
- **Pasta de almendra:** mezcla a partes iguales de pasta cruda de mazapán y azúcar en polvo, a la que se añade agua, obteniendo una concentración final del 66% (p/p) de azúcar.
- **Turrón de frutas:** masa de mazapán, con trozos de frutas confitadas distribuidos al azar en su interior, y cortada en forma de tabletas de turrón.
- **Marquesas:** mezcla de masa de mazapán con huevos enteros y almidón de trigo, con batido y cocción; la textura final es esponjosa.

La mayoría de las muestras analizadas presentaban una alteración característica, que consistía en la aparición de un olor intenso definido como a "petróleo", acompañado en ocasiones de un marcado reblandecimiento de la textura y/o del hinchamiento del envase. En la Fotografía 1 se muestra el abombamiento de uno de estos envases individuales.

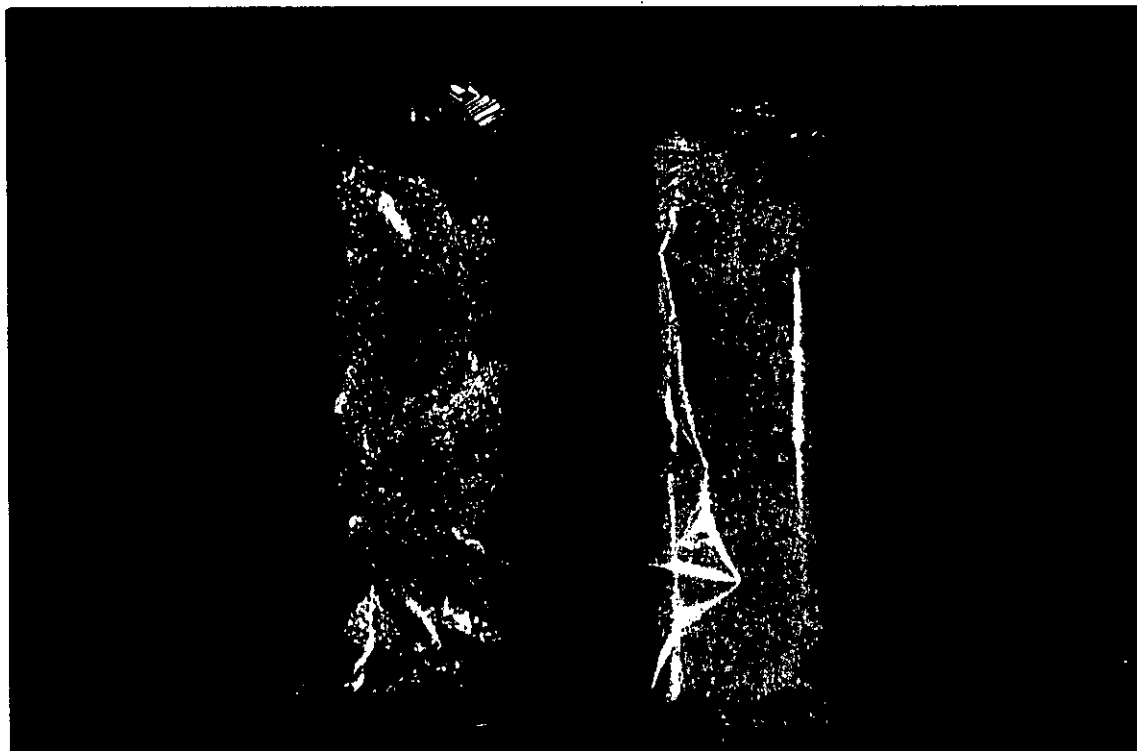
En las muestras de pasta de almendra, lo más característico de la alteración, además del olor a "petróleo" y el hinchamiento de algunos envases, es lo que muestran las Fotografías 2 y 3: el reblandecimiento de la textura se presenta en este caso como licuefacciones puntuales y circulares, en cuyo centro queda un punto de pasta aparentemente sin alterar, distribuidas al azar por la superficie y el interior de las piezas.



Fotografía 1.- Pasteles de yema. A la izquierda aparece una muestra sin alterar, y a la derecha una alterada. Se puede observar el abombamiento del envase de la muestra alterada.



Fotografía 2.- En el producto de la derecha se puede observar también el hichamiento del envase, además de la licuación puntual que se muestra con más detalle en la **Fotografía 3.**



Fotografía 3.- Barras de pasta de almendra, con visible alteración en la superficie. En el producto de la izquierda, la textura aparece totalmente licuada; en el de la derecha, la licuación ha tenido lugar en forma de círculos de aproximadamente 1 cm de diámetro, con un punto central de textura aparentemente sin alterar.

Además de las muestras de productos finales derivados de mazapán, se analizaron las distintas materias primas y productos intermedios utilizados para la elaboración de los primeros. La mayoría de las muestras de productos de mazapán fueron suministradas por una importante empresa fabricante, y el resto es de procedencia diversa.

El resto de muestras analizadas correspondieron a otros alimentos altamente azucarados de distinto origen, con alteración aparente o no:

- **Mermelada** de albaricoque.
- **Bolitas de coco:** coco confitado.
- **Yemas:** bolitas de yema de huevo confitada.
- **Cereales rellenos:** centro de uvas pasas, rodeada de fibras de cereales.
- **Miel.**

Todas las muestras analizadas se describen en las Tablas 4 a 6.

III.2.- Aislamiento de microorganismos

Una vez registradas y clasificadas las muestras, se pesó una cantidad representativa, 5 g, en condiciones asépticas y por duplicado, de cada una. Una de las porciones se homogeneizó en 50 mL de YMB (*Yeast Morphology Broth*, ver Apéndice I), que contiene 1% de glucosa. La otra porción de cada muestra se homogeneizó en 50 mL de YMB suplementado con glucosa hasta 330 g/L (Golden y Beuchat, 1990, 1992b), que se simbolizará como YMBG.

Una vez homogeneizada la muestra, a partir de cada matraz se realizó una primera siembra en superficie, mediante asa de siembra, en placas con YMA (*Yeast Morphology Agar*, ver Apéndice I), que se incubaron a 28°C durante 7 días. Este método de recuperación de microorganismos constituye, para este trabajo, el **aislamiento directo**.

Las muestras, homogeneizadas en sus respectivos medios líquidos, se mantuvieron en incubación durante 30 días a 28°C. Este período corresponde al **enriquecimiento** de las muestras. De cada matraz se realizaron sucesivos aislamientos a las 72 horas (E1), 10 días (E2), 20 días (E3) y 30 días (E4) en placas de YMA que se incubaron igualmente a 28°C durante 7 días.

De cada una de las placas, tanto las correspondientes al aislamiento directo como las de los sucesivos aislamientos de los medios de enriquecimiento, se seleccionaron todas aquellas colonias de levaduras y hongos filamentosos que presentaban una morfología distinta entre sí. Una vez realizado un agotamiento de asa de cada colonia elegida, a partir de una de las colonias aisladas se sembró un tubo de agar inclinado, cada uno de ellos constituyendo un cultivo puro.

Tabla 4.- Muestras analizadas de mazapán y productos derivados

Nº de muestra	Descripción	Alteración	Campaña fabricación/ año análisis
M1-M5	Pasteles de yema	Reblandecimiento, olor a "petróleo", gas en envase	1992/94
M6-M10	Pasteles de gloria	Reblandecimiento, olor a "petróleo"	1992/94
M11	Pan de Cádiz	Reblandecimiento, olor a "petróleo", gas en envase	1995
M11-a	Relleno superior		
M11-b	Relleno intermedio		
M11-c	Relleno inferior		
M11-d	Base mazapán		
M12	Pasteles de yema	Reblandecimiento, olor a "petróleo", gas en envase	1995
M13-15	Pasteles de yema	-	1995
M16	Pasteles de yema	Reblandecimiento, olor a "petróleo", gas en envase	1995
M17	Pan de Cádiz	Mohoso en superficie	1996
M28	Figuritas mazapán	-	1996
M29	Pan de Cádiz	-	1996
M30	Pasteles de yema	-	1996
M31	Pasteles de gloria	-	1996
M32, M33	Pasta de almendra	Licuefacción puntual, olor a "petróleo", gas en envase	1996
M34	Marquesas	Olor a "petróleo"	1995
M35	Turrón de frutas	Olor a "petróleo"	1996
M36	Marquesas	Olor a "petróleo"	1997

- = no alteración aparente.

Tabla 5.- Muestras analizadas de materias primas y productos intermedios de mazapán

Nº de muestra	Descripción	Alteración	Campaña fabricación/ año análisis
M18	Yema confitada	-	1996
M19	Boniato confitado	-	1996
M20	Masa recién "pasterizada"	-	1996
M21	Masa tras reposo de 48 h	-	1996
M22	Almendra variedad "colorada"	-	1996
M23	Almendra variedad "planeta"	-	1996
M24	Azúcar refinado	-	1997
M25	Azúcar refinado	-	1997
M26	Azúcar refinado	-	1997
M27	Azúcar refinado	-	1997

- = no alteración aparente.

Tabla 6.- Muestras analizadas de otros productos altamente azucarados

Nº de muestra	Descripción	Alteración	Campaña fabricación/ año análisis
M37	Mermelada de albaricoque	Licuefacción, gas	1997
M38	Miel para turrón	-	1997
M39	Miel	Turbidez	1997
M40	Bolitas de coco	Sabor a "queso"	1995/96
M41	Yemas	Mohosas	1995/96
M42	Cereales con pasas	Gas en envase	1998

- = no alteración aparente.

III.3.- Mantenimiento de las cepas

Las cepas de levaduras se mantuvieron en tubos de YMA (Barnett *et al.*, 1990) a 20°C durante el período de experimentación y se sembraron cada seis meses. El mantenimiento en un medio con glucosa como única fuente de carbono reduce el riesgo de cambios en las características del crecimiento y la fermentación (Yarrow, 1998). Estas cepas se conservaron también a -20°C con glicerol al 15% como crioprotector.

Los hongos también se conservaron en agar inclinado a 20°C, pero en este caso el medio de elección fue PDA (*Potato Dextrose Agar*) (ver Apéndice I). Las cepas se conservaron también a -20°C de la forma descrita para las levaduras.

III.4.- Identificación de levaduras

Las levaduras se identificaron mediante métodos clásicos, descritos por Lodder (1970) y van der Walt y Yarrow (1984), recopilados como manual por Barnett *et al.* (1990), basados en los caracteres morfológicos y fisiológicos resumidos en la Tabla 7.

- La **macromorfología** o morfología de las colonias se estudió en YMA a simple vista o con ayuda de una lupa (Nikon), observando caracteres como el borde y la sección transversal, la morfología del margen, el tipo de superficie, el brillo, la forma, la textura y la elevación. Otros caracteres, como formación de sedimento, velo, anillo o islotes, se estudiaron en medio líquido (YMB).

- La **micromorfología** y el **tipo de reproducción vegetativa** se estudiaron microscópicamente -con un microscopio Zeiss- en cultivos de 24-48 horas en medio líquido (YMB), describiéndose la forma celular, y el tipo de reproducción.

Tabla 7.- Caracteres estudiados en la identificación de levaduras

Caracteres morfológicos	
<i>Macromorfología</i>	morfología de la colonia
<i>Micromorfología</i>	morfología celular en medio líquido
<i>Tipo de reproducción vegetativa</i>	gemación o fisión
<i>Filamentación</i>	formación de pseudomicelio o micelio verdadero
<i>Esporulación</i>	formación, número y tipo de esporas
Caracteres fisiológicos	
<i>Fermentación de azúcares</i>	D-glucosa, D-galactosa, maltosa, metil- α -D-glucósido, sacarosa, α,α -trealosa, melibiosa, lactosa, celobiosa, melicitosa, rafinosa
<i>Asimilación de compuestos carbonados como única fuente de carbono</i>	D-glucosa, D-galactosa, L-sorbose, D-glucosamina, D-ribosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-arabinosa, L-ramnosa, sacarosa, maltosa, α,α -trealosa, metil- α -D-glucósido, celobiosa, salicina, melibiosa, lactosa, rafinosa, melicitosa, inulina, almidón, glicerol, eritritol, ribitol, xilitol, D-glucitol, D-manitol, galactitol, mio-inositol, D-glucono-1,5-lactona, 2-ceto-D-gluconato, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, DL-lactato, succinato, citrato, metanol, etanol, 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol
<i>Hidrólisis de arbutina</i>	
<i>Asimilación de compuestos nitrogenados como única fuente de nitrógeno</i>	nitrito, nitrito, etilamina, L-lisina, cadaverina, creatina, creatinina
<i>Crecimiento en ausencia de vitaminas</i>	
<i>Crecimiento a distintas temperaturas</i>	25, 30, 35, 37, 40°C
<i>Tolerancia a cicloheximida</i>	0,01, 0,1%
<i>Crecimiento en distintas concentraciones de glucosa</i>	50, 60% (p/p)
<i>Hidrólisis de urea</i>	

- Para la observación de la **filamentación** se utilizó la técnica de Dalmau. El medio, *Corn Meal Agar* (ver Apéndice I) se virtió en placas petri de 55 mm Ø y una vez sólido la levadura se inoculó realizando una incisión central con el asa de siembra. A continuación se depositó encima de la incisión un cubreobjetos estéril y las placas se incubaron a 28°C hasta tres semanas. Semanalmente se realizó una observación microscópica sin levantar el cubreobjetos, anotándose la ausencia de filamentos, pseudomicelio simple o elaborado o micelio verdadero.

- El estudio de la **esporulación** se describirá con detalle en el Apartado III.4.1.

- Para la **fermentación de carbohidratos**, el medio base (ver Apéndice I) se distribuyó a razón de 2 mL en tubos de fermentación (160 mm x 10 mm Ø) en los que se introdujo una campana Durham invertida. Las fuentes de carbohidratos se prepararon en concentraciones de 60 g/L en agua destilada, excepto la rafinosa, de la que se prepararon 120 g/L, y se esterilizaron por filtración. De cada solución concentrada se añadió 1 mL a los tubos que contenían el medio base, resultando una concentración final de 20 g/L de cada azúcar (40 g/L para la rafinosa).

Los tubos se inocularon con 0,1 mL de una suspensión densa (6 de la escala McFarland, $\approx 10^8$ células/mL) en agua de un cultivo de la levadura de 24-48 horas en YMA, y se incubaron a 28°C hasta 21 días. Se consideró como prueba positiva la presencia de ácido (viraje del indicador de color verde a amarillo) junto con la presencia de gas en la campana, siendo retrasada (*D = delayed*) cuando esto sucedió después de la segunda semana de incubación, y débil (*W = weak*) si el gas ocupaba menos de 1/3 del volumen de la campana.

- Para la **asimilación de compuestos carbonados** se dispuso una batería de tubos (180 mm x 16 mm Ø) conteniendo 4,5 mL de agua destilada estéril. Las fuentes de carbono se prepararon a una concentración de 50 g/L en YNB (*Yeast Nitrogen Base*) excepto la rafinosa, de la que se prepararon 100 g/L, y los alcoholes metanol, etanol, 1,2-propanodiol y 2,3-butanodiol, 40 g/L; las fuentes de ácidos orgánicos 2-ceto-D-gluconato, D-gluconato, D-glucuronato, D-galacturonato, DL-lactato, succinato y citrato se ajustaron

a pH 5,5. Todas las fuentes se esterilizaron por filtración y se añadieron a sus respectivos tubos de agua a razón de 0,5 mL cada una, resultando una concentración final del compuesto diez veces diluida respecto a la fuente. Se incluyó además un control negativo de crecimiento, añadiendo a uno de los tubos 0,5 mL de YNB sin fuente de carbono, y se consideró control positivo el tubo que contiene glucosa como fuente de carbono.

Los tubos se inocularon con 0,1 mL de una suspensión diluida (0,5 de la escala McFarland, $\approx 10^6$ células/mL) en agua de un cultivo de la levadura de 24-48 horas en YMA, y se incubaron a 28°C hasta 21 días. La observación de crecimiento por aparición de turbidez se consideró un resultado positivo.

- La **hidrólisis de arbutina** se estudió en medio de cultivo sólido (ver Apéndice I). En la escisión del compuesto, la hidroxiquinona liberada reacciona con las sales férricas presentes en el medio, dando lugar a un compuesto que confiere al medio un color marrón oscuro.

El medio se inoculó con una gota de una suspensión densa (≈ 6 de la escala McFarland) en agua de un cultivo de la levadura de 24-48 horas en YMA, y se incubó a 28°C hasta 15 días.

- Para la **asimilación de compuestos nitrogenados** se procedió como en el caso de compuestos de carbono, utilizando como medio base para las fuentes y para el control negativo YCB (*Yeast Carbon Base*). La concentración de los compuestos en las fuentes fue, en g/L, la siguiente: nitrato 7,8; nitrito 2,6; etilamina 6,4; L-lisina 5,6; cadaverina 6,8; y creatina y creatinina 6,0. La inoculación, incubación y lectura de las pruebas fue similar a las descritas para la asimilación de fuentes de carbono.

- El **crecimiento en ausencia de vitaminas** se comprobó inoculando un tubo con 5 mL del medio base indicado en el Apéndice I con 0,1 mL de la suspensión diluida de la levadura. La incubación y lectura se realizó como en el caso de las asimilaciones.

- Para estudiar el **crecimiento a distintas temperaturas**, se inocularon, a partir de la misma suspensión diluida (0,5 de Mc Farland) con la que se siembran las asimilaciones, tubos conteniendo 5 mL de YMB, incubándose a continuación a las temperaturas elegidas durante 4 días. El crecimiento se detectó por la aparición de turbidez abundante.

- La **resistencia a la cicloheximida** se estudió inoculando, a partir de la misma suspensión diluida con la que se sembraron las asimilaciones, dos tubos con 5 mL de medio (ver Apéndice I) conteniendo, respectivamente, 0,1 y 1 g/L del compuesto. La lectura se realizó como en el caso de las asimilaciones.

- El **crecimiento en 50 y 60% (p/p) de glucosa**, o crecimiento en medios con elevada presión osmótica, se estudió en medios sólidos con las referidas concentraciones de azúcar, cuya composición se especifica en el Apéndice I. Las placas se inocularon con gotas de la suspensión densa (6 de McFarland) de la levadura y se incubaron a 28°C durante dos semanas, sellando la placa para evitar la evaporación de agua.

- La **hidrólisis de urea** se estudió sembrando con una gota de la suspensión densa (6 de McFarland) de la levadura una placa agar urea de Christensen (ver Apéndice I), que se incubó a 28°C durante un máximo de dos semanas. La ureasa, en caso de que la levadura posea esta enzima, cataliza la escisión de urea en amoníaco y carbamato; este último se autohidroliza para dar ácido carbónico y otra molécula de amoníaco. La reacción global conduce a un incremento en el pH, que provoca un viraje del indicador de su forma ácida (amarilla) a básica (rosa intenso).

III.4.1.- Esporulación

Para el estudio de los caracteres de la reproducción sexual -formación de zigotos, ascas y ascosporas-, se realizó un estudio más amplio que el descrito en los métodos tradicionales de identificación de levaduras, debido a la dificultad conocida de observación de esporas en determinadas especies de levaduras. Para ello, se seleccionaron diversos medios de cultivo con objeto de determinar las condiciones más adecuadas para la esporulación de las cepas de levadura incluidas en este trabajo.

Los **medios de presporulación** empleados, cuya composición se detalla en el Apéndice I, fueron los siguientes (se incluyen las notaciones abreviadas que se emplearán en apartados posteriores):

- *Yeast Morphology Agar* = YMA, o *Yeast Morphology Broth* = YMB (Barnett *et al.*, 1990).
- PRE-1 (Codón *et al.*, 1995).
- PRE-2 (Codón *et al.*, 1995).

Los **medios de esporulación**, de composición detallada en el Apéndice I, fueron los siguientes:

- Medios sembrados a partir de YMA (en sólido) o YMB (en líquido):
 - YMA o YMB.
 - YMA o YMB con 20 g/L de NaCl = 2% NaCl (Barnett *et al.*, 1990; Davenport, 1980)
 - Agar o caldo de extracto de levadura, glucosa y peptona (*Yeast extract - Glucose - Peptone*) = YEGP (Barnett *et al.*, 1990)
 - Agar o caldo extracto de malta = EM (Barnett *et al.*, 1990).
 - Agar de patata glucosado = PDA (Barnett *et al.*, 1990).
 - Agar o caldo de Gorodkova = GOR (Barnett *et al.*, 1990).
 - Agar o caldo V-8 (8 vegetales) = V8 (Barnett *et al.*, 1990).
 - Agar o caldo V-8 diluido 10 veces = V8/10 (Giménez-Jurado, G., comunicación personal).
 - Agar de Levine con eosina y azul de metileno = EMB (Davenport, 1980).
 - Agar o caldo con manitol y acetato = MAc (Davenport, 1980).
 - Agar o caldo acetato de Fowell = AA-1 (Miller, 1989; Barnett *et al.*, 1990).
 - Agar o caldo acetato de Kleyn = AA-2 (Miller, 1989).
 - Agar o caldo acetato de McClary = AA-3 (Miller, 1989; Barnett *et al.*, 1990).
 - Agar infusión de maíz (*Corn Meal Agar*) = CMA (Davenport, 1981; Barnett *et al.*, 1990).
- Medio sembrado a partir de PRE-1:
 - SPO-1 (Codón *et al.*, 1995).

- Medio sembrado a partir de PRE-2:
-SPO-2 (Codón *et al.*, 1995).

A partir de cultivos de 48-72 h de cada cepa a ensayar, las levaduras se inocularon mediante asa de siembra en los medios de presporulación, en forma líquida y sólida. Los tubos y placas se incubaron durante 48-72 h a 28°C para recoger las cepas en fase estacionaria temprana (Codón *et al.*, 1995) y transferirlas a sus respectivos medios de esporulación, inoculando los sólidos a partir de las placas y los líquidos a partir de los tubos. El medio CMA se sembró mediante la técnica de Dalmau, realizando con el asa de siembra cargada una incisión central en el agar y depositando sobre ella a continuación un cubreobjetos estéril.

La incubación de los medios de esporulación se realizó a una temperatura subóptima de 20°C (van der Walt y Yarrow, 1984; Barnett *et al.*, 1990; Codón *et al.*, 1995).

La observación microscópica de los cultivos en los medios de esporulación, excepto CMA, se realizó al cabo de 3, 7, 21, 28 días, y a las 6 semanas (van der Walt y Yarrow, 1984; Barnett *et al.*, 1990; Codón *et al.*, 1995). De los cultivos en CMA se realizó una única observación después de 6 semanas de incubación, levantando el cubreobjetos y tomando una muestra con el asa de siembra de la zona del cultivo cercana al borde del cubreobjetos, donde es más probable que tenga lugar la esporulación (Barnett *et al.*, 1990). La observación se realizó mediante preparaciones en fresco, observando con 400 y 1000 aumentos.

III.5.- Identificación de hongos filamentosos

Para la identificación presuntiva de las cepas de hongos filamentosos a nivel de género, según el método descrito por von Arx (1981), se realizó una resiembra de las mismas en placas de agar extracto de malta o MEA (ver Apéndice I), que se incubaron a 25°C durante cinco días. Tras el período de incubación, se llevó a cabo una primera observación directa de las placas, así como una observación microscópica de una preparación de cada cepa.

Las especies del género *Aspergillus* se distinguen por la presencia de una estructura característica, el **aspergilo**, que consta de una **vesícula** globosa cubierta de al menos una capa de **fiálides** (células alargadas), a partir de las cuales se forman las esporas asexuales, llamadas **conidios**. La vesícula nace de un largo filamento denominado **estipe**.

Por su parte, la característica distintiva del género *Penicillium* es la formación de conidios en cadena a partir de verticilos o fiálides, que se disponen dando lugar a una estructura característica en forma de pincel denominada por ello **penicilio**. En el penicilio, a diferencia del aspergilo, las fiálides surgen directamente del estipe, o de unas células soporte que constituyen la **médula** y las **ramas**. En algunas especies, entre la médula y las ramas existen las **rámulas**. Se denomina penicilio a la estructura completa soportada por el estipe; la estructura incluyendo el estipe es el **conidióforo**, y el conidióforo surge de una **hifa fértil**.

III.5.1.- Identificación de *Aspergillus*

La identificación de las especies de *Aspergillus* se llevó a cabo según el sistema propuesto por Klich y Pitt (1988), basado en el crecimiento sobre tres medios de cultivo y la incubación durante siete días a dos temperaturas distintas.

Los medios empleados, cuya composición se detalla en el Apéndice I, fueron los siguientes:

- Agar Czapek extracto de levadura (*Czapek Yeast Extract Agar*) = CYA.
- Agar extracto de malta (*Malt Extract Agar*) = MEA.
- CYA con 200 g/L (20% p/v) sacarosa = CY20S.

Las cepas a identificar se sembraron en MEA y se incubaron a 25°C durante 3 días. A partir de este cultivo se sembraron dos placas del medio CYA, una de las cuales se incubó a 25°C y la otra a 37°C. De los medios MEA y CY20S, se sembró una única placa y se incubó a 25°C.

La siembra se realizó inoculando en tres puntos equidistantes del centro y de los bordes de la placa, y entre sí. Para evitar la dispersión de las esporas, que darían lugar a colonias independientes fuera de los puntos elegidos, las placas se inocularon, con asa de siembra, a partir de una suspensión de esporas en una solución de Tween 80 (Fluka) de 0,5 g/L en agua destilada. Tras el período de incubación, se procedió a la observación de los siguientes caracteres:

a) *Caracteres macroscópicos:*

- Diámetro de las colonias: medida en mm por el reverso de la placa. De la placa correspondiente a cada medio se registró el valor medio del diámetro de las tres colonias.
- Color de los conidios y del micelio.
- Presencia y color del exudado (gotas en la superficie de la colonia).
- Color del agar bajo la colonia (reverso de la placa) y/o del agar circundante (pigmento soluble).
- Presencia, profundidad y textura de los surcos en la colonia.

b) *Caracteres microscópicos:* para la observación microscópica, se preparó una muestra en portaobjetos depositando, sobre una gota de Tween 80 al 0,05%, una porción del micelio del hongo crecido en CYA recogida con aguja de siembra. Se examinaron:

- Forma y tamaño de las vesículas, médula, fiálides y conidios.
- Textura de la superficie de los conidios.
- Longitud, grosor de la pared, color y textura de la superficie del estipe.
- Aspergilo uniseriado (sólo fiálides), biseriado (médula y fiálides) o mezcla de ambos.
- Disposición columnar o radial de los conidios en el aspergilo.

III.5.2.- Identificación de *Penicillium*

La identificación de las especies de *Penicillium* se llevó a cabo según el sistema propuesto por Pitt (1991), basado en el crecimiento sobre tres medios de cultivo y la incubación durante siete días a tres temperaturas distintas. Como referencia se utilizó el atlas y manual de Ramírez (1982).

Los medios empleados, cuya composición se detalla en el Apéndice I, fueron los siguientes:

- Agar Czapek extracto de levadura (*Czapek Yeast Extract Agar*) = CYA.
- Agar extracto de malta (*Malt Extract Agar*) = MEA.
- Agar nitrato glicerol al 25% (*25% Glycerol Nitrate Agar*) = G25N.

Las cepas a identificar se resembraron en MEA y se incubaron a 25°C durante 3 días. A partir de este cultivo se sembraron tres placas del medio CYA, incubando cada una a una temperatura: 5, 25 y 37°C. De los medios MEA y G25N, se sembró una única placa y se incubó a 25°C.

La siembra en MEA y CYA 25°C se realizó inoculando en tres puntos, tal como se detalló en el Apartado III.5.1. El resto de las placas se inocularon en dos puntos equidistantes entre sí y del borde de la placa. Para la inoculación se empleó una suspensión de esporas cuya preparación también se ha descrito en el Apartado III.5.1. Tras el período de incubación, se procedió a la observación de los siguientes caracteres:

a) Caracteres macroscópicos:

- Diámetro de las colonias: la medida se llevó a cabo como se ha descrito para *Aspergillus*.
- Características de las colonias: pigmentación, exudado, textura, estriación, grado de esporulación y disposición de los conidios.

b) Caracteres microscópicos: una vez elaborada la preparación microscópica tal como se ha descrito en el apartado anterior, se examinaron:

- Número de ramificaciones en el penicilio: una (monoverticilado), dos (biverticilado), tres (terverticilado) e incluso cuatro (cuaterverticilado).
- Longitud y forma de las fiálides: ampuliformes (en forma de botella) o acerosas (en forma de aguja).
- Forma y tamaño de los conidios.
- Textura de la superficie de los estipes y los conidios.

III.6.- Reproducción de las alteraciones

III.6.1.- Reproducción del olor a "petróleo"

Para la reproducción del olor a "petróleo" detectado en las muestras de mazapán y derivados se utilizó una modificación de las condiciones experimentales descritas para tal fin en un trabajo previo (Casas *et al.*, 1996). El medio experimental se constituyó de la siguiente manera: como medio base se empleó el Caldo Nutritivo n°2 (Oxoid), al que se añadió azúcar de mesa (sacarosa) en proporción 1:1 (p:v), resultando una concentración final de azúcar de 600 g/L. A este medio se adicionaron 0,5 g/L de sorbato potásico (Scharlau), resultando un pH final de aproximadamente 6,3.

Las cepas a ensayar se inocularon en frascos herméticos de vidrio con 50 mL del medio experimental. Como inóculo se utilizó 1 mL de una suspensión de turbidez equivalente al 6 de McFarland, preparado a partir de un cultivo de 48-72 horas de las cepas en YMA. La incubación se llevó a cabo a 28°C hasta un total de 30 días. Los resultados correspondientes a crecimiento, olor a "petróleo" y presencia de gas, se registraron cada 48 horas.

III.6.2.- Reproducción de las licuefacciones puntuales

III.6.2.1.- Reproducción *in situ*. Para reproducir esta alteración de la textura se cortaron, en condiciones estériles, porciones transversales de aproximadamente 1 cm de ancho de muestras de pasta de almendra sin alterar. De cada microorganismo aislado a partir de estas muestras se obtuvo un cultivo de 24-48 horas y se sembró por duplicado en una porción: en un extremo mediante siembra en masa en superficie, y en el otro extremo por picadura en profundidad. Estas porciones se incubaron individualmente, en tubos herméticos de plástico transparente, a 28°C hasta un total de 30 días.

III.6.2.2.- Reproducción en medios experimentales. Puesto que los ingredientes fundamentales de la pasta de almendra son 66% de azúcar y prácticamente el resto (≈33%)

almendra, se prepararon medios experimentales con distintas proporciones de los mismos, para determinar las condiciones experimentales de reproducción del efecto.

Los medios empleados, cuya composición y método de preparación se detallan en el Apéndice I, fueron los siguientes:

- 66% (p/p) sacarosa + 34% (p/p) almendra.
- 1% (p/p) sacarosa + 99% (p/p) almendra.
- 660 g/L sacarosa + 5 g/L almendra.

De estos medios se prepararon dos series, una con 1 g/L de sorbato y otra sin conservante.

Las placas se sembraron, mediante asa de siembra, a partir de cultivos de 24-48 horas de las cepas a ensayar, y se incubaron a 28°C hasta un total de 60 días. Se realizó una comprobación visual de la aparición de licuefacción cada 2-3 días.

III.7.- Estudio del mecanismo de licuefacción

Para estudiar por separado la posible degradación y/o utilización de distintos componentes de la pasta de almendra, azúcar (sacarosa) y almendra (grasa, proteínas, almidón, pectina) se emplearon los siguientes medios, cuya composición y método de preparación se detallan en el Apéndice I:

a) Medios para detección de acidificación/inversión de azúcar:

- YMA + 660 g/L sacarosa + indicadores de pH: azul de bromofenol, rojo congo, verde de bromocresol y rojo de metilo.
- *Chalk agar* (Davenport, 1981).

b) Medios para detección de lipólisis:

- Medio de Gorodkova para lipólisis (Spencer-Martins, I., comunicación personal), con 50 g/L de aceite de almendras.
- Agar tributirina (British Standards Institution, 1940) + 5 g/L glucosa.
- Base de agar tributirina + 5 g/L glucosa + aceite de almendras, sustituyendo éste a la tributirina.

c) Medios para detección de proteolisis:

- YMA + 10 g/L gelatina.
- Agar de Frazier = agar caseinato cálcico (Merck) + 5 g/L glucosa.

d) Medio para detección de amilolisis:

- YMA + 10 g/L almidón.

e) Medio para detección de pectinólisis:

- Medio inductor de pectinasa (Cruickshank, 1983) + 50 g/L glucosa.

De los medios b a e se preparó una segunda serie, añadiendo un 660 g/L de sacarosa. Todos los medios se prepararon, además, por duplicado: una serie en ausencia de conservante y otra serie añadiendo 1 g/L de sorbato potásico, con la finalidad de comprobar si la presencia de sorbato era determinante en la aparición de la alteración característica.

Los medios se prepararon en placas tal y como se describe en el Apéndice I, y se inocularon, mediante siembra en masa, con cultivos de 24-48 horas de las levaduras. La incubación se realizó a 28°C y se prolongó hasta 60 días, realizando comprobaciones visuales cada 2-3 días o un revelado final de las placas, según el medio de que se trate, lo que se especifica en el Apéndice I.

III.8.- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del ácido sórbico

Esta determinación se llevó a cabo mediante la técnica de **microcultivo** (Eklund, 1983; Kinderlerer y Hatton, 1990; Golden y Beuchat, 1992b; Skirdal y Eklund, 1993), es decir, experimentos de crecimiento en placas de 96 micropocillos de fondo plano (Costar).

Se preparó un gradiente de concentración de ácido sórbico combinando en los pocillos diferentes volúmenes de un medio base junto con volúmenes adecuados de una solución concentrada (2 g/L) de sorbato potásico en caldo nutritivo n° 2 (Oxoid), esterilizada por filtración. Como medio base se utilizó el Caldo Nutritivo n°2 (Oxoid) con azúcar de mesa (sacarosa) en concentraciones de 10 y 600 g/L. El pH de la solución de conservante y el de los medios base se ajustó a pH 5,0 con HCl 1N, para favorecer la conversión del sorbato potásico en ácido sórbico.

El correspondiente medio base y la solución de conservante se dispensaron por separado en los pocillos con pipeta automática (Gilson); cada pocillo contenía un volumen final de medio de 200 μ L. Las concentraciones de conservante ensayadas fueron, en g/L: 0 (usada como control positivo de crecimiento), 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 y 1,2. Las ocho concentraciones crecientes se dispusieron en una columna de la placa multipocillo, de manera que cada columna correspondía a la determinación de CMI para una levadura, bien en 10 o bien en 600 g/L de sacarosa.

Cada columna se inoculó, mediante pipeta multicanal (LabSystem), con 15 μ L de una suspensión de la cepa seleccionada, preparada en agua destilada estéril, equivalente al estándar 0,5 de la escala Mc Farland. Las placas, una vez inoculadas, se sellaron con Parafilm "M" y se incubaron en estático a 28°C durante un máximo de 15 días, considerando crecimiento positivo la presencia de turbidez en el pocillo. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

III.9.- Caracterización del compuesto responsable del olor a "petróleo"

En 1966, Marth *et al.* fueron los primeros en describir la capacidad de algunos hongos del género *Penicillium* de descarboxilar el sorbato, dando lugar a un compuesto, el 1,3-pentadieno, cuyo característico olor descrito como a "petróleo", "pintura" o "hidrocarburo" parece coincidir con el detectado en las muestras del presente trabajo que presentaban esta alteración. Por tanto, los análisis que se describen a continuación tienen como finalidad confirmar si el pentadieno es el metabolito responsable del olor a "petróleo" en las muestras.

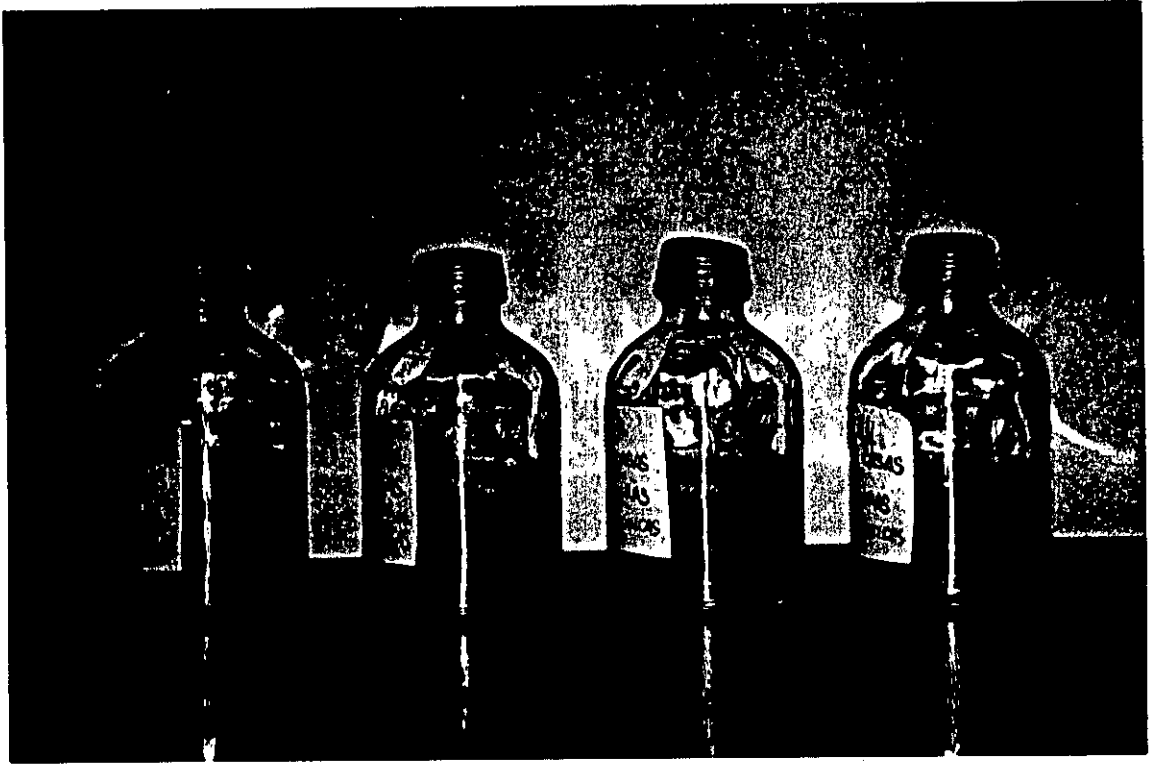
III.9.1.- Identificación de 1,3-pentadieno

El compuesto responsable del olor a "petróleo" se identificó mediante Cromatografía de Gases (*Gas Chromatography*, GC) acoplada a Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*, MS). La técnica de análisis se adaptó a partir de las descritas por Liewen y Marth (1985b) y Kinderlerer y Hatton (1990).

En la técnica de Espectrometría de Masas, el vapor de una muestra se ioniza positivamente a baja presión por bombardeo con una corriente electrónica de baja energía. Los iones moleculares así obtenidos se separan según su relación de masa (m) a carga iónica (z), dando lugar al llamado espectro de masas de dicha muestra. En el espectro de masas se representa la cantidad relativa de cada ion con su correspondiente relación m/z . Cuando se trata de una muestra compleja, es decir, de una mezcla de compuestos, la Espectrometría de Masas debe estar precedida por una Cromatografía de Gases separativa. Así, conectando la salida de un cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas se puede obtener información estructural -espectro de masas- para cada uno de los componentes de la mezcla original, previamente inyectada en el cromatógrafo, a medida que éstos son eluidos en serie, en forma de picos separados, de la columna cromatográfica.

Las cepas de microorganismos productores del olor característico en presencia de sorbato se inocularon en viales de medio experimental con sorbato, cuya composición se detalla en el Apéndice I, con 1 mL de una suspensión densa (6 de Mc Farland) de cultivos de 48-72 horas. El medio experimental fue el mismo descrito para la reproducción del olor (Casas *et al.*, 1996), conteniendo 0,5 g/L de sorbato potásico, repartido a razón de 20 mL en viales de 50 mL. Tras cerrar los viales herméticamente con tapón de goma y sellarlos con Parafilm "M", se incubaron a 28°C durante 72 horas. Estos viales son los que se muestran en la Fotografía 4.

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II (Hewlett-Packard Company, HP) acoplado a un espectrómetro de masas 5971 A Mass Selective Detector (HP), y empleando para la integración de datos un computador tipo PC con programa HP ChemStation. La columna empleada para la cromatografía de gases fue de tipo capilar, de sílice vítrea, con una longitud de 25 m y un diámetro interno de 0,25 mm, con fase estacionaria SE-54; el espesor de la película era de 0,31 μm . El detector, incluido en el espectrómetro de masas, era un cuadrupolo con un voltaje de ionización de 70 eV.



Fotografía 4.- Viales empleados para la identificación de 1,3-pentadieno

La inyección de gas de cabeza de cada muestra se llevó a cabo en *split* (división de flujo), con relación de flujo 1:50. El análisis se desarrolló a una temperatura constante de 40°C utilizando como gas portador helio a una presión de 8 psi. La temperatura del inyector fue de 250°C. El volumen de gas de cabeza inyectado, con jeringa hermética Hamilton, fue de 1 μ L.

El compuesto analizado se identificó mediante comparación de su espectro de masas con los espectros contenidos en la base de datos del programa de integración de datos. Además, se inyectaron 1 μ L de 1,3-pentadieno (mezcla de isómeros *cis* y *trans*) y 1 μ L de isopreno (2- metil-1,3-butadieno), ambos de Aldrich Chemical, como patrones.

III.9.2.- Cuantificación de la producción de pentadieno a partir de sorbato

Para este experimento, se seleccionaron dos cepas de levaduras productoras de pentadieno, representantes de aquellas especies causantes de esta alteración, que se

sembraron en el medio experimental anteriormente descrito en presencia de tres concentraciones iniciales diferentes de sorbato potásico: 0,25, 0,50 y 1,00 g/L.

El medio se repartió a razón de 15 mL en viales de 25 mL, reservando un vial con 15 mL de medio base sin sorbato. Una vez crecidas en medio sólido (YMA), se realizó una suspensión densa (6 de McFarland) de cada cepa en agua destilada estéril, de la que se sembró 1 mL en tres viales de cada concentración de sorbato, para realizar el experimento por triplicado, y en el vial sin sorbato, reservando este último para el recuento inicial y final de células. También se reservaron tres viales sin sembrar, cada uno correspondiente a una de las tres concentraciones de sorbato ensayadas, para la determinación de sorbato (recuperación de la concentración inicial).

III.9.2.1.- Cuantificación de sorbato en los medios. Este estudio se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Montañó *et al.* (1995), introduciendo las modificaciones necesarias.

La cuantificación de sorbato se realizó sobre los 15 mL de medio reservados sin inocular de cada una de las tres concentraciones iniciales ensayadas, así como a partir de cada uno de los frascos incubados con las levaduras.

III.9.2.1.1.- Extracción y preparación de las muestras. En primer lugar, el contenido de cada frasco se traspasó a tubos gruesos con tapón esmerilado, y se añadieron 2 mL de una solución de H_2SO_4 0,1N, para transformar el sorbato potásico en ácido sórbico ($pK_a = pH$ 4,76); los tubos se calentaron en un baño a $100^\circ C$ durante 15-20 minutos, para favorecer la reacción. A continuación, se realizaron tres extracciones consecutivas con 25 mL cada una de una mezcla a partes iguales de éter etílico y éter de petróleo. Tras agitarlos con fuerza, los tubos se mantuvieron en reposo unos 20 minutos, hasta la desaparición de turbidez en el éter. La fase etérea de cada tubo se extrajo mediante pipeta y se transfirió a un matraz de fondo redondo y cuello esmerilado. Después de las tres extracciones, el disolvente se evaporó en un rotavapor, quedando en el fondo del matraz un residuo en el que se encontraba el ácido sórbico extraído.

El residuo obtenido tras cada extracción se resuspendió en 2 mL de metanol y se traspasó a un eppendorf tras filtrarlo, mediante una jeringa, a través de un filtro de membrana Fluoropore (Millipore) de 0,5 μm . De las suspensiones correspondientes a los medios sin inocular que contenían 0,25, 0,50 y 1,00 g/L de sorbato se realizó además una dilución 1/100, tomando 100 μL y enrasando hasta 10 mL en metanol.

Para la posterior cuantificación del sorbato de las muestras, se preparó una **solución patrón** de sorbato potásico de alta pureza SigmaUltra (Sigma Chemical) de concentración 0,4 g/L en agua desionizada mediante sistema Milli-Q (Millipore). De esta solución se transfirieron 1, 3 y 5 mL a matraces aforados, enrasando hasta 50 mL con una solución acuosa de H_2SO_4 0,0085N (pH \approx 2). Las concentraciones finales del compuesto fueron, respectivamente, de 0,008, 0,024 y 0,40 g/L.

III.9.2.1.2.- Condiciones de HPLC. Para la separación analítica se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficacia de Hewlett-Packard modelo 1040 con un sistema cuaternario de entrada de disolventes, equipado con un detector de UV/visible de diodos modelo Hewlett-Packard modelo 1040 A. La columna empleada fue un modelo Hewlett-Packard de 250 mm x 4 mm \varnothing de acero inoxidable con tipo de relleno C18 Hypersil ODS, con partículas esféricas de 5 μm . Los disolventes empleados fueron de calidad HPLC (Scanlab). La cromatografía se desarrolló en fase reversa.

La separación se llevó a cabo mediante un gradiente del eluyente A (H_3PO_4 40 g/L en agua) y del eluyente B (acetonitrilo), empezando a tiempo 0 hasta tiempo 5 minutos con una composición semifinal del eluyente B del 6%. La composición del disolvente en gradiente se sigue desde tiempo 5 minutos hasta 15 minutos con una composición final del eluyente B del 20%, manteniéndose hasta 25 minutos. La velocidad de flujo empleada fue de 0,8 mL/minuto, y la detección espectrofotométrica se monitorizó a una longitud de onda $\lambda=264$ nm. Al final del gradiente, la columna se reequilibró hasta conseguir las condiciones iniciales con un nuevo gradiente desde tiempo 25 minutos hasta 30 minutos con una composición final del eluyente B del 6%.

Se realizaron, por duplicado, inyecciones de 20 µL con jeringa Hamilton tanto de los patrones como de las muestras. Los datos obtenidos se procesaron en un ordenador Hewlett-Packard modelo 9000/300, con un programa de integración para evaluar el área y altura de los picos.

III.9.2.1.3.- Cuantificación de sorbato. La determinación del sorbato presente en las muestras se llevó a cabo utilizando como patrón externo la solución de sorbato potásico de alta pureza descrita anteriormente. Con las áreas -valor de absorbancia- de los picos obtenidos de las tres diluciones de la suspensión patrón y sus correspondientes concentraciones conocidas de ácido sórbico se construyó, mediante el programa estadístico Instat, una curva de calibración consistente en una recta de regresión.

Atendiendo al tiempo de retención de los picos obtenidos en el cromatograma de las muestras, y por comparación con el tiempo de retención del compuesto patrón, se determinó el área del pico correspondiente al ácido sórbico. La concentración de sorbato de las muestras se calculó aplicando la ecuación de la recta de regresión, teniendo en cuenta los correspondientes factores de dilución empleados en la preparación de las muestras cromatográficas, así como la conversión de sorbato potásico en ácido sórbico y viceversa, atendiendo a sus distintos pesos moleculares.

III.9.2.1.4.- Estudio de recuperación. Para evaluar la recuperación del conservante a partir del medio de cultivo, se emplearon los viales reservados previamente sin inocular de cada una de las concentraciones de sorbato ensayadas, es decir, 0,25, 0,50 y 1,00 g/L.

Comparando cada una de las concentraciones recuperadas con las esperadas (concentraciones iniciales), se calculó un factor medio de recuperación, que se aplicó posteriormente a las concentraciones de sorbato obtenidas de los viales inoculados.

III.9.2.2.- Cuantificación de pentadieno en los medios. Los análisis se llevaron a cabo mediante la misma técnica adaptada de Liewen y Marth (1985b) y Kinderlerer y Hatton (1990) descrita en el apartado anterior.

Tanto la preparación de los medios de cultivo como la inoculación de los mismos ha sido descrita en el inicio del Apartado III.9.2. La adición de concentraciones crecientes de sorbato dio lugar a un incremento de pH, tal como habían observado Marth *et al.* (1966). Así, mientras que el pH del medio base sin conservante fue de 6,20, con la adición de 0,25, 0,50 y 1,00 g/L de sorbato los medios alcanzaron un pH final de 6,26, 6,30 y 6,36, respectivamente.

Justo después de inocular las cepas, se realizó una primera cuantificación de pentadieno (día 0). A continuación, los viales se incubaron a 28°C durante cuatro días, realizando sucesivas cuantificaciones a las 24 (día 1), 48 (día 2), 72 (día 3) y 96 (día 4) horas. Estas cuantificaciones se llevaron a cabo inyectando un volumen de 1 µL del gas de cabeza de cada vial, y anotando la abundancia máxima de uno de los iones del espectro de masas del 1,3-pentadieno correspondiente al pico cromatográfico.

La cuantificación se realizó mediante patrón externo. Para ello, se preparó una serie de viales que contenían 15 mL del medio de cultivo estéril, y en cada uno se inyectó uno de los siguientes volúmenes de pentadieno patrón: 3 µL, 10 µL y 30 µL; de cada volumen se prepararon tres viales. Los dos primeros volúmenes se inyectaron en el medio, a través del tapón de goma del vial, mediante jeringa hermética Hamilton; el tercer volumen se inyectó, también en el medio, mediante pipeta automática Gilson. Los viales se agitaron suavemente para conseguir una distribución homogénea del pentadieno en el medio.

Estos viales se incubaron a 28°C durante cuatro días, para permitir que el compuesto inyectado alcance un equilibrio entre la fase acuosa y el gas de cabeza. Tras este período, se procedió a la inyección de 1 µL del gas de cabeza de cada vial, determinando la abundancia máxima del ion del espectro elegido. A través de la correspondencia entre la abundancia de este ion en el espectro de masas y el volumen de pentadieno inyectado en el medio, se construyó una recta de regresión, mediante el programa informático Statgraphics plus versión 2.1, que permitió expresar en unidades de volumen las abundancias del ion del espectro medidas en las muestras inoculadas con una levadura.

III.9.2.3.- Determinación de biomasa. Para este experimento, se determinó el número de células con que se inocularon los viales (**recuentos iniciales**), así como el número de células presente en cada vial tras el período de incubación (**recuentos finales**).

- Para los **recuentos iniciales**, se empleó el vial con 15 mL de medio base sin sorbato inoculado con la misma suspensión de células de levadura que los demás viales. Esta suspensión inicial contendrá el mismo número de células que los viales del ensayo, y se incubó junto con ellos.

La determinación del número de células viables se llevó a cabo mediante diluciones sucesivas. A partir de un número adecuado de diluciones, éstas se sembraron, a razón de 0,1 mL, en placas de YMA, extendiendo el inóculo con asa de vidrio (asa Drigalski). Este método de **recuento en superficie** es más recomendable que el tradicional de homogeneizar inóculo y medio fundido, ya que se evita la inactivación térmica de las células y/o la inhibición de algunas especies aerobias (no fermentativas) por la reducción en la disponibilidad de oxígeno (Davenport, 1981; Deak y Beuchat, 1996).

- Los **recuentos finales** se realizaron como en el caso de los iniciales.

A los valores obtenidos de los recuentos de cada cepa se les aplicó un estudio estadístico para estimar si las diferencias entre los tres valores que dan lugar a cada media son significativos, y para determinar si los recuentos obtenidos para cada concentración de sorbato son significativamente diferentes a los obtenidos para las demás concentraciones. El análisis estadístico consistió en los correspondientes **tests de ANOVA** (análisis de la varianza) realizados mediante el programa informático MicroCal Origin versión 4.0.

III.10.- Prueba estandarizada para la reproducción del olor a "petróleo"

La reproducción del olor a "petróleo" se realizó en el mismo medio, con 600 g/L de sacarosa y 0,5 g/L de sorbato potásico. Este medio se repartió a razón de 12 mL en tubos herméticos -con tapón de rosca- de vidrio (120 mm x 15 mm Ø).

Las cepas seleccionadas se sembraron en una placa de YMA por agotamiento de asa, para obtener colonias aisladas, y en otra placa se sembraron en masa, para conseguir un crecimiento abundante.

La inoculación de las cepas se llevó a cabo mediante dos técnicas distintas:

- Inoculación de una colonia aislada de la levadura.
- Inoculación de 1 mL de una suspensión densa (equivalente al 6 de la escala McFarland) de la levadura en YMB.

En ambos casos, se ensayó una inoculación directa en el medio experimental, así como inoculaciones tras distintos tiempos de incubación en YMB (preincubación): 2, 4, 8 y 24 horas. Tras el período de preincubación, los tubos de YMB se agitaron y se transfirió 1 mL al correspondiente tubo de medio experimental.

La incubación de los tubos de preincubación y los tubos con medio experimental se realizó a 28°C. La producción de olor y/o gas se comprobó cada 8 horas.

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Microorganismos aislados e identificación**IV.1.1.- Levaduras****Tabla 8.- Levaduras aisladas de muestras de mazapán y productos relacionados**

Número de cepa	Muestra de procedencia	Técnica de aislamiento	Identificación
1E	M1	YMBG, 14 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
2E	M9	YMBG, 7 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
3E	M6	YMBG, 7 días	<i>Debaryomyces hansenii</i>
4E	M6	YMBG, 7 días	<i>Debaryomyces hansenii</i>
10E	M7	YMBG, 14 días	<i>Debaryomyces hansenii</i>
14D	M11	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
15D	M11	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
14E1	M11	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
14E2	M11	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
14E4	M11	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
16D	M11-a	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
17D	M11-a	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
16E1	M11-a	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
16E2	M11-a	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
16E3	M11-a	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
16E4	M11-a	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
18D	M11-b	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
19D	M11-b	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
18E1	M11-b	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
18E2	M11-b	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
18E3	M11-b	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
18E4	M11-b	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
20D	M11-d	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

21D	M11-d	Aislamiento directo	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
20E2	M11-d	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
20E3	M11-d	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
20E4	M11-d	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
22E1	M11-c	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
22E2	M11-c	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
22E3	M11-c	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
22E4	M11-c	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
24E1	M12	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
24E2	M12	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
24E3	M12	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
24E4	M12	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
26E1	M16	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
26E2	M16	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
26E3	M16	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
26E4	M16	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
29E1	M28	YMBG, 3 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
29E2	M28	YMBG, 10 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
29E3	M28	YMBG, 20 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30E1	M29	YMBG, 3 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
30E2(1)	M29	YMBG, 10 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30E2(2)	M29	YMBG, 10 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30E3	M29	YMBG, 20 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
30E4	M29	YMBG, 30 días	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
32E1	M30	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
32E2	M30	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
32E3	M30	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
32E4	M30	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
33E1(1)	M31	YMBG, 3 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
33E1(2)	M31	YMBG, 3 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
33E2(1)	M31	YMBG, 10 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>

33E2(2)	M31	YMBG, 10 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
33E3	M31	YMBG, 20 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
33E4	M31	YMBG, 30 días	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
34E1(1)	M32	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
34E1(2)	M32	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
34E2	M32	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
34E3	M32	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
34E4	M32	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E1(1)	M33	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E1(2)	M33	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E2(1)	M33	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E2(2)	M33	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E3(1)	M33	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E3(2)	M33	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
35E4	M33	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
36E1	M35	YMBG, 3 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
36E2	M35	YMBG, 10 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
36E3	M35	YMBG, 20 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
36E4	M35	YMBG, 30 días	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

Tabla 9.- Levaduras aisladas de materias primas

Número de cepa	Muestra de procedencia	Técnica de aislamiento	Identificación
27E1(1)	M22	YMBG, 3 días	<i>Issatchenkia orientalis</i>
27E1(2)	M22	YMBG, 3 días	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
27E2(1)	M22	YMBG, 10 días	<i>Issatchenkia orientalis</i>
27E2(2)	M22	YMBG, 10 días	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
27E3(1)	M22	YMBG, 20 días	<i>Issatchenkia orientalis</i>
27E3(2)	M22	YMBG, 20 días	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
28E2	M23	YMBG, 10 días	<i>Candida glabrata</i>
28E3(1)	M23	YMBG, 20 días	<i>Candida glabrata</i>
28E3(2)	M23	YMBG, 20 días	<i>Candida glabrata</i>
28E4(1)	M23	YMBG, 30 días	<i>Candida glabrata</i>
28E4(2)	M23	YMBG, 30 días	<i>Candida glabrata</i>
28E4(3)	M23	YMBG, 30 días	<i>Candida glabrata</i>

Tabla 10.- Levaduras aisladas de otros productos altamente azucarados

Número de cepa	Muestra de procedencia	Técnica de aislamiento	Identificación
38E1	M37	YMBG, 3 días	<i>Pichia guilliermondii</i>
38E2	M37	YMBG, 10 días	<i>Pichia guilliermondii</i>
38E3	M37	YMBG, 20 días	<i>Pichia guilliermondii</i>
38E4	M37	YMBG, 30 días	<i>Pichia guilliermondii</i>
39E2	M38	YMBG, 10 días	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>
39E3	M38	YMBG, 20 días	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>
39E4	M38	YMBG, 30 días	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>

Zygosaccharomyces rouxii

(Fotografía 9)

Utilización de azúcares

Glucosa	F	Maltosa	F	Galactosa	A
---------	---	---------	---	-----------	---

Asimilación de otras fuentes de carbono

Glicerol	A	D-manitol	A	D-gluconato	A
D-glucitol	A	D-glucono-1,5-lactona	A		

Asimilación de compuestos nitrogenados

Etilamina	A	L-lisina	A	Cadaverina	A
-----------	---	----------	---	------------	---

Crecimiento en ausencia de vitaminas V

<u>Crecimiento a distintas temperaturas</u>	37°C +	40°C -
---	--------	--------

Formación de pseudomicelio V

Estado asexual no descrito. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; ausencia de filamentos, o pseudomicelio simple; ascas persistentes, conteniendo de 1 a 4 ascosporas redondas, de pared gruesa o fina; ausencia de conjugación, o célula a célula, a veces sólo tras la mezcla de cepas sexualmente compatibles.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Debaryomyces hansenii

(Fotografía 10)

Asimilación de fuentes de carbono (A)

Glucosa	Galactosa	Sorbosa	Ramnosa
Sacarosa	Maltosa	α,α -trealosa	Metil- α -D-glucósido
Celobiosa	Salicina	Arbutina	Melibiosa V
Lactosa	Rafinosa	Melicitosa	Inulina V
Glicerol	Eritritol	Ribitol	Xilitol
D-glucitol V	D-manitol	D-gluconato	D-glucono-1,5-lactona
D-glucuronato	DL-lactato	Citrato	Etanol

Asimilación de compuestos nitrogenados

Etilamina	L-lisina	Cadaverina	Creatina	Creatinina V
-----------	----------	------------	----------	--------------

Crecimiento en ausencia de vitaminas +Crecimiento a distintas temperaturas 30°C + 35°C -Tolerancia a cicloheximida 0,01% V 0,1% -

Estado asexual: *Candida famata*. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; ausencia de filamentos; ascas persistentes, conteniendo de 1 a 2 ascosporas redondas, de pared gruesa.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Issatchenkia orientalis

(Fotografía 11)

Asimilación de azúcares

Glucosa F

Asimilación de otras fuentes de carbono

Glicerol	A	D-glucono-1,5-lactona	A	DL-lactato	A
Succinato	A	Citrato	A	Etanol	A

Asimilación de compuestos nitrogenados

Etilamina	A	L-lisina	A	Cadaverina	A
-----------	---	----------	---	------------	---

Crecimiento en ausencia de vitaminas

-

Crecimiento a distintas temperaturas

37°C +

40°C +

Formación de pseudomicelio

+

Estado asexual: *Candida krusei*. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; pseudomicelio elaborado.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Torulaspota delbrueckii

(Fotografía 12)

Asimilación de azúcares

Glucosa	F	Maltosa	F	Metil- α -D-glucósido	F
Sacarosa	F	α,α -trealosa	F		
Melicitosa	F	Rafinosa	F		

Asimilación de otros compuestos carbonados

2-ceto-D-gluconato	A	DL-lactato	A	Etanol	A
--------------------	---	------------	---	--------	---

Asimilación de compuestos nitrogenados

L-lisina	A
----------	---

<u>Crecimiento a distintas temperaturas</u>	37°C	+	40°C	-
---	------	---	------	---

<u>Crecimiento en altas concentraciones de glucosa</u>	50%	+	60%	+
--	-----	---	-----	---

Estado asexual: *Candida colliculosa*. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; ausencia de filamentos; ascas persistentes, conteniendo de 1 a 4 ascosporas redondas, de pared gruesa.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Candida glabrata

(Fotografía 13)

Asimilación de azúcares

Glucosa	F	α,α -trealosa	F
---------	---	---------------------------	---

Asimilación de otros compuestos carbonados

Glicerol	A	D-glucono-1,5-lactona	A
D-gluconato	A	DL-lactato	V

Crecimiento a distintas temperaturas 37°C + 40° +

Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; ausencia de filamentos; ausencia de reproducción sexual.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Saccharomyces cerevisiae

(Fotografía 14)

Asimilación de azúcares

Glucosa	F	Galactosa	F	Maltosa	F
Sacarosa	F	Melibiosa	F,-	Celobiosa	F
Melicitosa	F	Rafinosa	F	α,α -trealosa	F,A
Metil- α -D-glucósido	F				

Asimilación de otros compuestos carbonados

Etanol A Lactato V

Crecimiento en ausencia de vitaminas +Crecimiento a distintas temperaturas 37°C + 40°C VFormación de pseudomicelio +

Estado asexual: *Candida robusta*. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; pseudomicelio simple; ascas persistentes, conteniendo de 1 a 4 ascosporas redondas, de pared gruesa; ausencia de conjugación.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Lodderomyces elongisporus

(Fotografía 15)

Asimilación de azúcares*

Glucosa	F	α,α -trealosa	F,A	Galactosa	F,A
Sorbosa	A	Sacarosa	A	Maltosa	A
Melicitosa	A	D- xilosa	A	Metil- α -D-glucósido	A

Asimilación de otros compuestos carbonados

Glicerol	A	Ribitol	A	Xilitol	A
Glucitol	A	Manitol	A	D-gluconato	A
Succinato	A	Citrato	A	Etanol	A
D-glucono-1,5-lactona	A	2-ceto-D-gluconato	A		

Asimilación de compuestos nitrogenados

Etilamina	A	L-lisina	A	Cadaverina	A
-----------	---	----------	---	------------	---

Crecimiento en ausencia de vitaminas VCrecimiento a distintas temperaturas 37°C + 40°C +Tolerancia a cicloheximida 0,01% + 0,1% +Crecimiento en altas concentraciones de glucosa 50% V 60% -Formación de pseudomicelio +

Estado asexual no descrito. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; pseudomicelio elaborado.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

*Otros compuestos asimilados como fuente de carbono por algunas cepas: D-glucosamina -33E2(1)-, D-ribosa -33E1(2), 33E2(1), 33E3-, L-ramnosa -33E1(1), 33E2(1), 33E2(2)-, celobiosa -33E1(1), 33E2(1), 33E2(2)-, salicina -33E1(1), 33E2(1), 33E2(2)-, arbutina -33E2(1).

Pichia guilliermondii

(Fotografía 16)

Asimilación de azúcares

Glucosa	F	Galactosa	F	Sacarosa	F
Melibiosa	F	α,α -trealosa	F	Rafinosa	F
Sorbosa	A	Xilosa	A	Glucosamina	A
L-arabinosa	A	D-arabinosa	A	Ramnosa	A
Maltosa	A	Celobiosa	A	Metil- α -D-glucósido	A
Salicina	A	Arbutina	A	Melibiosa	A
Rafinosa	A	Melicitosa	A	Inulina	A

Asimilación de otros compuestos carbonados

Glicerol	A	Ribitol	A	Xilitol	A
Glucitol	A	Manitol	A	Galactitol	A
Succinato	A	Citrato	A	Etanol	A
D-gluconato	?	D-glucono-1,5-lactona			A

Asimilación de compuestos nitrogenados

Etilamina	A	L-lisina	A	Cadaverina	A
-----------	---	----------	---	------------	---

Crecimiento en ausencia de vitaminas VCrecimiento a distintas temperaturas 37°C + 40°C +Tolerancia a cicloheximida 0,01% + 0,1% +Formación de pseudomicelio +

Estado asexual: *Candida guilliermondii*. Colonias de color blanco a cremoso, butirosas; reproducción vegetativa por gemación; ausencia de filamentos, o pseudomicelio elaborado; no se observan ascosporas (en forma de sombrero); la conjugación es célula a célula tras la mezcla de cepas sexualmente compatibles, pero la esporulación es extremadamente escasa (Barnett *et al.*, 1990).

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

Schizosaccharoromyces octosporus

(Fotografías 17 y 18)

Asimilación de azúcares

Glucosa	F	Maltosa	F,A,(-)	Metil- α -D-glucósido	A,F,(-)
---------	---	---------	---------	------------------------------	---------

<u>Crecimiento en altas concentraciones de glucosa</u>	50%	+	60%	+
--	-----	---	-----	---

<u>Hidrólisis de urea</u>	+
---------------------------	---

Estado asexual no descrito. Colonias de color crema a tostado, butirosas; reproducción vegetativa por fisión; ausencia de filamentos; ascas evanescentes, conteniendo de 1 a 8 ascosporas ovales o redondas, de pared fina; ausencia de conjugación, o célula a célula.

F = fermentado y asimilado; A = asimilado pero no fermentado; V = variable; + = crecimiento (turbidez) en el medio; - = ausencia de crecimiento.

IV.1.2- Hongos filamentosos

Tabla 11.- Hongos filamentosos aislados de distintos productos

Número de cepa	Muestra de procedencia	Identificación
H1	M11	<i>Penicillium chrysogenum</i>
H2	M11	<i>Penicillium crustosum</i>
H3	M34	<i>Penicillium chrysogenum</i>
H4	M17	<i>Penicillium chrysogenum</i>
H5	M35	<i>Penicillium chrysogenum</i>
H6	M36	<i>Penicillium simplicissimum</i>
H7	M39	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i>

Aspergillus niger var. niger

Subgénero: *Circumdati*

Sección: *Nigri*

Características macroscópicas

Diámetro de las colonias en CYA 7 mm. Áreas conidiales negras, densamente pobladas. Hifas hialinas, blancas. Reverso blanco amarillento. Colonias densas, granulares, ligeramente surcadas por la variación en longitud de las hifas. Diámetro de las colonias a 37°C 7 mm.

Diámetro de las colonias en CY20S 7 mm. Colonias similares en apariencia a las crecidas en CYA, pero los aspergilos incluso más densamente empaquetados.

Diámetro de las colonias en MEA 7 mm. Áreas conidiales negras. Micelio blanco e hialino. Reverso incoloro. Colonias granulares.

Características microscópicas

Cabezas conidiales radiadas. Paredes de los estipes finas. Vesículas prácticamente esféricas. Aspergilo biseriado. Médula cubriendo virtualmente la superficie completa de la vesícula. Conidios globosos, de paredes no muy ásperas, con resaltes irregularmente distribuidos.

Caracteres distintivos

Colonias negras, aspergilo biseriado con vesículas grandes, médula de mediana longitud, conidios irregularmente ornamentados.



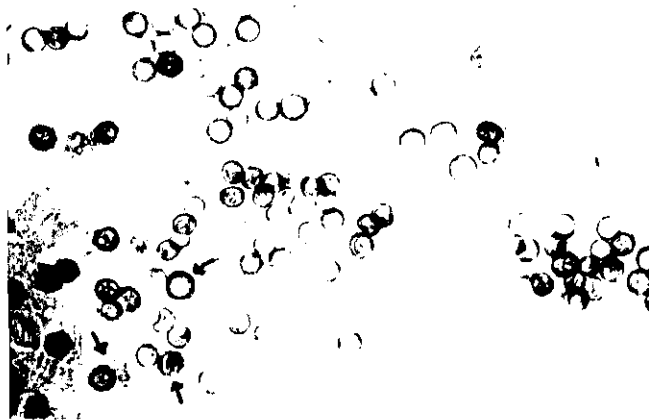
5a



5b



5c



5d

Fotografía 5.- Anverso (a) y reverso (b) de las colonias de *A. niger* crecidas en CYA, MEA y C20G. En c se puede observar el aspergilo biseriado, y en d los conidios ornamentados, señalados con flechas.

Penicillium chrysogenum

Subgénero: *Penicillium*

Sector: *Penicillium*

Características macroscópicas

Diámetro de las colonias en CYA 35-38 mm, surcadas radialmente y aterciopeladas. Micelio blanco amarillento. Conidios de color verde azulado. Exudado transparente y reverso amarillo brillante debido a la presencia de pigmento soluble de este color; otras colonias carecen de exudado y de pigmento, por lo que el reverso es pálido. Colonias microscópicas a 5°C. A 37°C, colonias de 1-8 mm.

Diámetro de las colonias en MEA 35-45 mm, planas, superficiales y granulares. Micelio hialino. Conidios de color verde azulado. Reverso verde pálido.

Colonias en G25N 17-25 mm, densas y radialmente surcadas. Reverso amarillo pálido.

Características microscópicas

Estipes con paredes finas y lisas. Penicilio típicamente terverticilado, terminal y compacto, con una o dos ramas. Médula corta y fiálides ampuliformes. Conidios subesferoidales, de paredes finas, dispuestos en columnas largas e irregulares.

Caracteres distintivos

Las colonias crecen rápidamente en los medios comunes a 25°C, produciendo en CYA un abundante crecimiento de color verde azulado por la presencia de los conidios y amarillo por la producción de pigmento soluble en el reverso. Microscópicamente, los penicilios son terverticilados y de paredes finas. Algunas cepas carecen de pigmentación amarilla.



6a



6b



6c

Fotografía 6.- Anverso (a) y reverso (b) de las colonias de *P. chrysogenum* crecidas en CYA, MEA y G25N. En c se puede observar la estructura del penicilio y la morfología de los conidios.

Penicillium crustosum

Subgénero: *Penicillium*

Sector: *Penicillium*

Características macroscópicas

Diámetro de las colonias en CYA 30 mm, planas, típicamente bajas, con aspecto aterciopelado y superficie pulverulenta. Micelio blanco e hialino. Conidios de color verde oscuro, muy abundantes en todo el área de la colonia, que en los márgenes adquiere color gris azulado. Exudado naranja oscuro. Reverso marrón oscuro por la producción de pigmento de este color. No crecimiento a 5 ni a 37°C.

Diámetro de las colonias en MEA 30 mm, planas y bajas. El micelio penetra en el medio. conidiogénesis abundante, formando masas características de conidios verdes de apariencia pulverulenta, que se desprenden en gran número cuando se agita la placa. Reverso verde pálido.

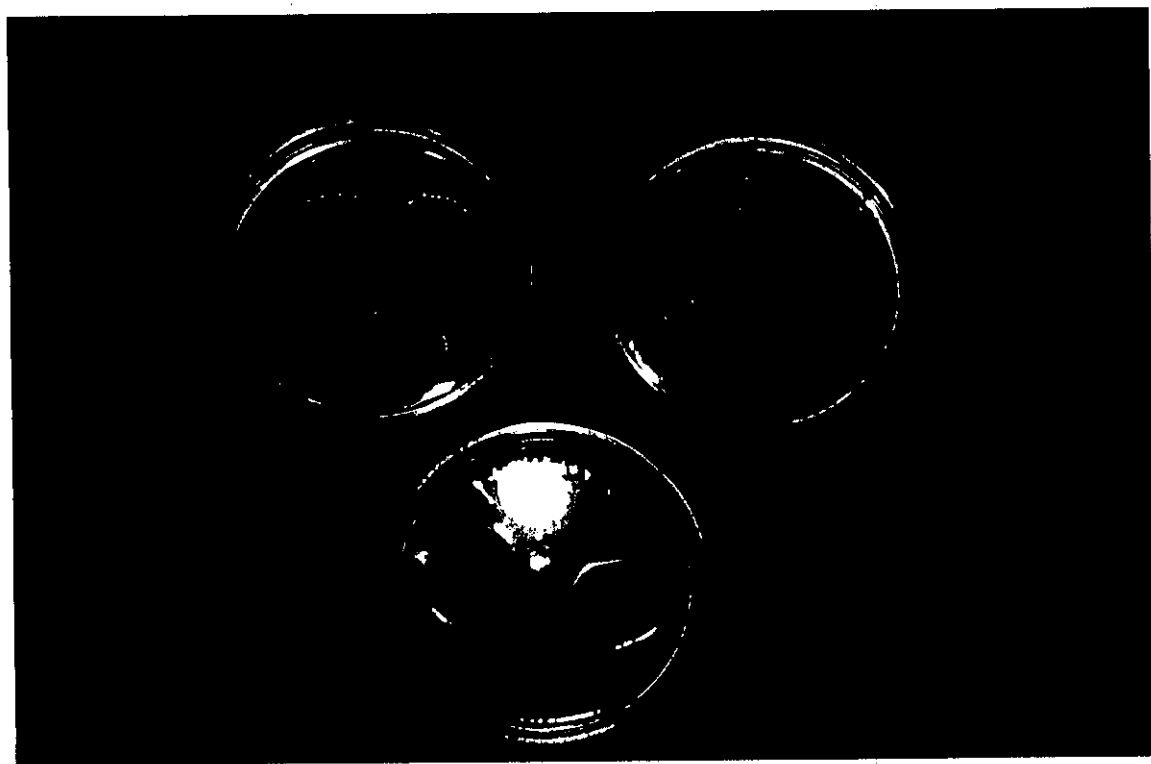
Diámetro de las colonias en G25N 20 mm, finamente surcadas radialmente, profundas y densas. Reverso amarillo.

Características microscópicas

Estipes de paredes ásperas, sosteniendo penicilios terminales terverticilados de elementos largos y muy juntos. Generalmente dos ramas por penicilio. Fiálides ampuliformes. Conidios elipsoidales, de paredes lisas, dispuestos en largas columnas paralelas, que en MEA se adhieren formando masas.

Caracteres distintivos

Las colonias de *P. crustosum* en CYA son verde oscuro, pero verdeazuladas en los márgenes. Todos los elementos del conidióforo son largos, y las paredes de los estipes son ásperas. Tras el crecimiento en MEA durante 7-10 días, *P. crustosum* produce gran cantidad de conidios, que se liberan con facilidad cuando se agita la placa. Este carácter es decisivo y sumamente útil en la identificación de esta especie.



7a



7b



7c

Fotografía 7.- Anverso (a) y reverso (b) de las colonias de *P. crustosum* crecidas en CYA, MEA y G25N. En c se puede observar la estructura del penicilio y la morfología de los conidios.

Penicillium simplicissimum

Subgénero: *Furcatum*

Sector: *Furcatum*

Características macroscópicas

Diámetro de las colonias en CYA 46 mm (típicamente 40-50), surcadas radialmente. Micelio denso, blanquecino. Conidiogénesis moderada, de color típicamente verde grisáceo. Reverso típicamente pálido. No germinación a 5°C, y a 37°C colonias de 7 mm.

La mayoría de los aislamientos del hemisferio norte crecen a 37°C, pero muchos de Australia y Nueva Zelanda no; estos aislamientos del sur crecen a veces a 5°C (Pitt, 1991).

Diámetro de las colonias en MEA 45 mm (típicamente 40-50 mm), planas y aterciopeladas. Micelio blanco. Conidiogénesis moderada, de color verde grisáceo. Reverso pálido.

Diámetro de las colonias en G25N 18 mm, arrugadas y flocosas (peludas). Micelio blanco. Reverso pálido.

Características microscópicas

Estipes de paredes no muy ásperas, de los que parten verticilos a veces irregulares de médulas y ramas bien definidas, y muy raramente conidióforos o médulas fuera de la posición terminal o subterminal. Verticilos de 2-3 médulas de paredes ásperas. Fiálides ampuliformes, que se estrechan abruptamente dando lugar a un largo cuello del que parten conidios esféricos o subesferoidales, de paredes gruesas y dispuestos en cadenas desordenadas.

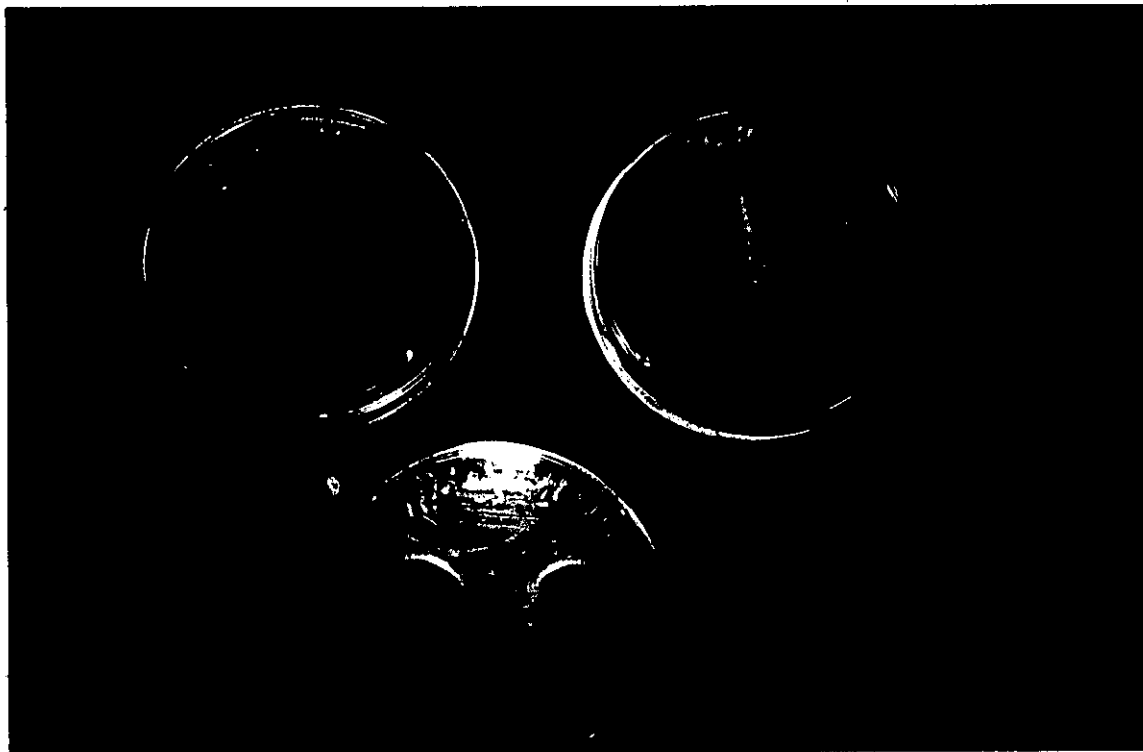
Los conidios son muy variables en forma entre aislamientos, y frecuentemente incluso dentro de una misma preparación microscópica (Pitt, 1991).

Caracteres distintivos

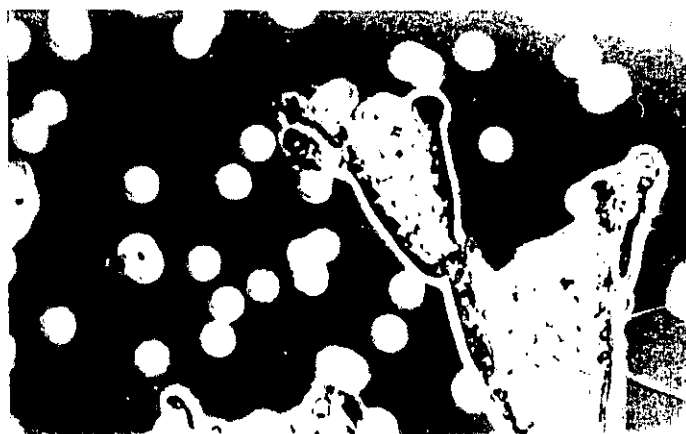
Los aislamientos de *P. simplicissimum* crecen rápidamente a 25°C, formando colonias relativamente profundas debido a la longitud de los conidióforos. Estos conidióforos son característicos: los estipes son largos y gruesos, de paredes ásperas, con médulas terminales o subterminales y ramas. Los conidióforos cortos y las médulas intercalares son muy infrecuentes.



8a



8b



8c

Fotografía 8.- Anverso (a) y reverso (b) de las colonias de *P. simplicissimum* crecidas en CYA, MEA y G25N. En c se puede observar la estructura del penicilio y la morfología de los conidios.

IV.2.- Esporulación en cepas representativas**Tabla 12a.- Esporulación de cepas representantes en diversos medios de cultivo**

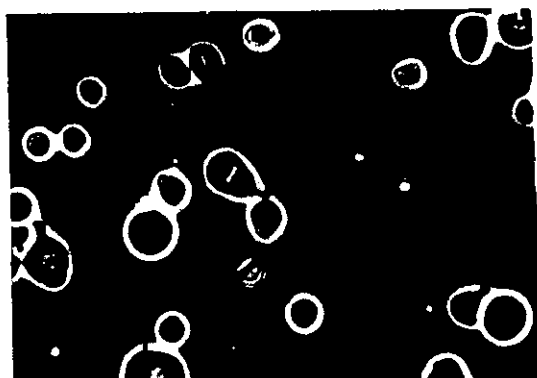
Número de cepa	YMA	2% NaCl	YEGP	EM	PDA	GOR	V8	V8/10
1E	+	+	-	+	+	+	-	+
2E	-	-	-	-	-	-	-	-
3E	+	+	+	-	+	+	+	+
4E	+	+	+	-	+	-	+	+
10E	+	+	+	-	+	+	+	+
14D	-	-	-	-	-	-	-	-
24E1	+	+	+	+	+	+	+	+
26E1	-	+	+	+	-	+	+	+
27E1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
27E1(2)	+	-	+	-	+	+	+	+
29E1	+	+	+	+	+	+	+	+
30E1	-	-	-	-	-	-	-	-
32E1	-	+	-	+	+	-	+	+
33E1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
33E1(2)	-	-	-	-	-	-	-	-
34E1(1)	-	+	+	+	-	+	-	+
34E1(2)	-	+	+	+	+	+	+	+
35E1(1)	-	-	-	+	+	+	-	+
35E1(2)	+	-	-	+	+	-	-	+
36E1	+	+	+	+	-	+	-	+
38E1	-	-	-	-	-	-	-	-
39E2	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 12b.- Esporulaci3n de cepas representantes en otros medios de cultivo

N3mero de cepa	EMB	MAc	AA-1	AA-2	AA-3	CMA	SPO-1	SPO-2
1E	+	-	-	-	+	-	-	-
2E	-	-	-	-	-	-	-	-
3E	+	-	-	-	+	+	-	+
4E	+	-	-	+	+	+	+	+
10E	+	-	-	+	-	+	+	-
14D	-	-	-	-	-	-	-	-
24E1	+	-	-	-	-	-	-	-
26E1	+	-	-	-	-	-	-	-
27E1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
27E1(2)	+	+	-	+	+	+	+	+
29E1	+	+	-	-	+	+	+	+
30E1	-	-	-	-	-	-	-	-
32E1	-	-	-	+	-	-	-	-
33E1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-
33E1(2)	-	-	-	-	-	-	-	-
34E1(1)	+	-	-	-	-	-	-	-
34E1(2)	+	-	-	-	-	+	-	-
35E1(1)	+	+	-	+	+	+	-	+
35E1(2)	-	-	-	-	-	-	-	-
36E1	+	-	-	-	-	-	-	-
38E1	-	-	-	-	-	-	-	-
39E2	-	-	+	-	-	-	-	-

+ = presencia de ascosporas en el medio.

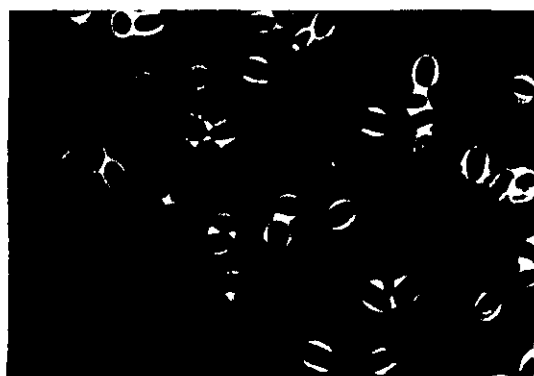
- = ausencia de ascosporas observadas.



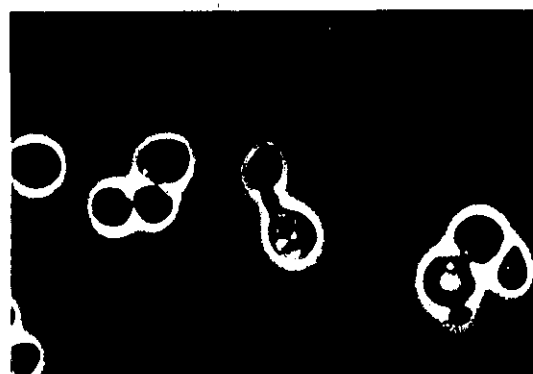
9



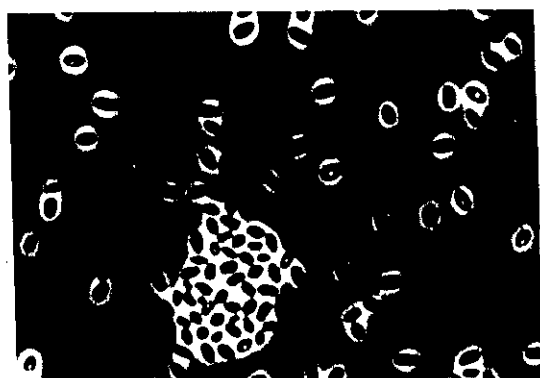
10



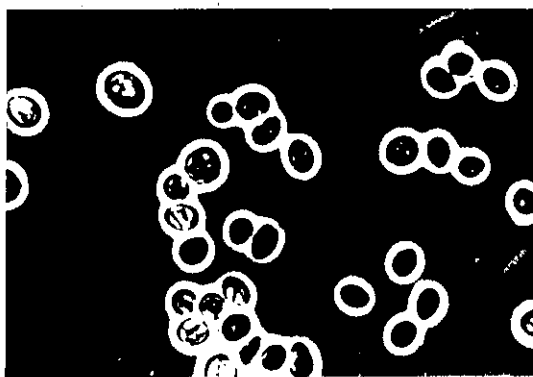
11



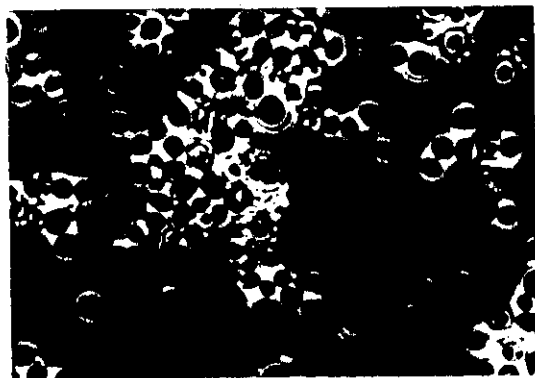
12



13



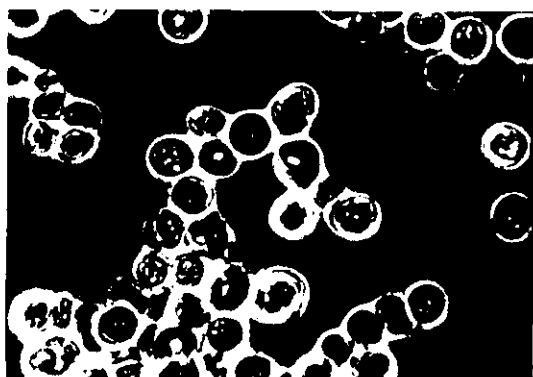
14



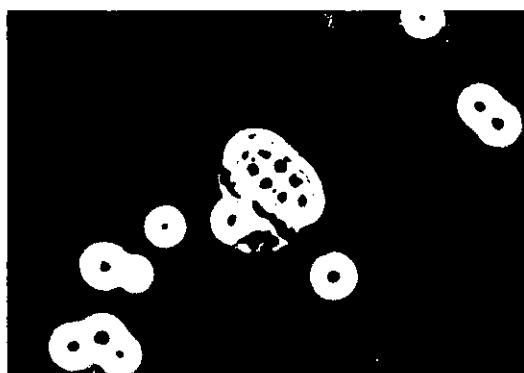
15



16



17



18

Fotografías 9 a 18. Células de levadura crecidas en el medio de esporulación V8/10 durante 28 días a 20°C. 9: *Z. rouxii* cepa 32E1; en el centro de la imagen, dos células conjugadas, y dentro de una de ellas la presencia de dos esporas. 10: *D. hansenii* cepa 4; señaladas con flechas, células conjugadas con sus yemas y una gran espora de pared gruesa en el interior de las células madre. 11: *I. orientalis* cepa 27E1(1), células sin esporular. 12: *T. delbrueckii* cepa 27E1(2); en el centro de la imagen, dos células conjugadas, unidas por un grueso tubo de conjugación, y en el interior de una de ellas cuatro esporas, tres de ellas visibles. 13: *C. glabrata* cepa 28E2, células vegetativas. 14: *S. cerevisiae* cepa 29E1; señalada con una flecha, célula que contiene en su interior cuatro esporas situadas en dos planos, de las que se observan tres. 15: *L. elongisporus* cepa 33E1(1), células sin esporular; 16: *P. guilliermondii* cepa 38E1, células no esporuladas. 17 y 18: *S. octosporus*; en 17, señalada con una flecha, célula en división mediante fisión, en la que se aprecia la formación de un tabique central; en 18, célula con ocho esporas en su interior.

IV.3.- Reproducción de las alteraciones**IV.3.1.- Reproducción de olor a "petróleo" y/o gas****Tabla 13.- Reproducción de olor a "petróleo" y/o gas por las cepas de levaduras aisladas de productos de mazapán**

Cepa	Especie	Olor	Gas	Cepa	Especie	Olor	Gas
1E	<i>Z. rouxii</i>	+	+	26E3	<i>Z. rouxii</i>	+	-
2E	<i>Z. rouxii</i>	+	+	26E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+
3E	<i>D. hansenii</i>	+	-	29E1	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
4E	<i>D. hansenii</i>	+	-	29E2	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
10E	<i>D. hansenii</i>	+	-	29E3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
14D	<i>Z. rouxii</i>	+	+	30E1	<i>L. elongisporus</i>	-	-
14E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+	30E2(1)	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
14E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+	30E2(2)	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
14E4	<i>Z. rouxii</i>	+	-	30E3	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
15D	<i>Z. rouxii</i>	-	+	30E4	<i>S. cerevisiae</i>	-	-
16D	<i>Z. rouxii</i>	-	+	32E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+
16E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+	32E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+
16E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+	32E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+
16E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+	32E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+
16E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+	33E1(1)	<i>L. elongisporus</i>	-	-
17D	<i>Z. rouxii</i>	+	+	33E1(2)	<i>L. elongisporus</i>	-	-
18D	<i>Z. rouxii</i>	+	+	33E2(1)	<i>L. elongisporus</i>	-	-
18E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+	33E2(2)	<i>L. elongisporus</i>	-	-
18E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+	33E3	<i>L. elongisporus</i>	-	-
18E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+	33E4	<i>L. elongisporus</i>	-	-
18E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+	34E1(1)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
19D	<i>Z. rouxii</i>	+	+	34E1(2)	<i>Z. rouxii</i>	+	+

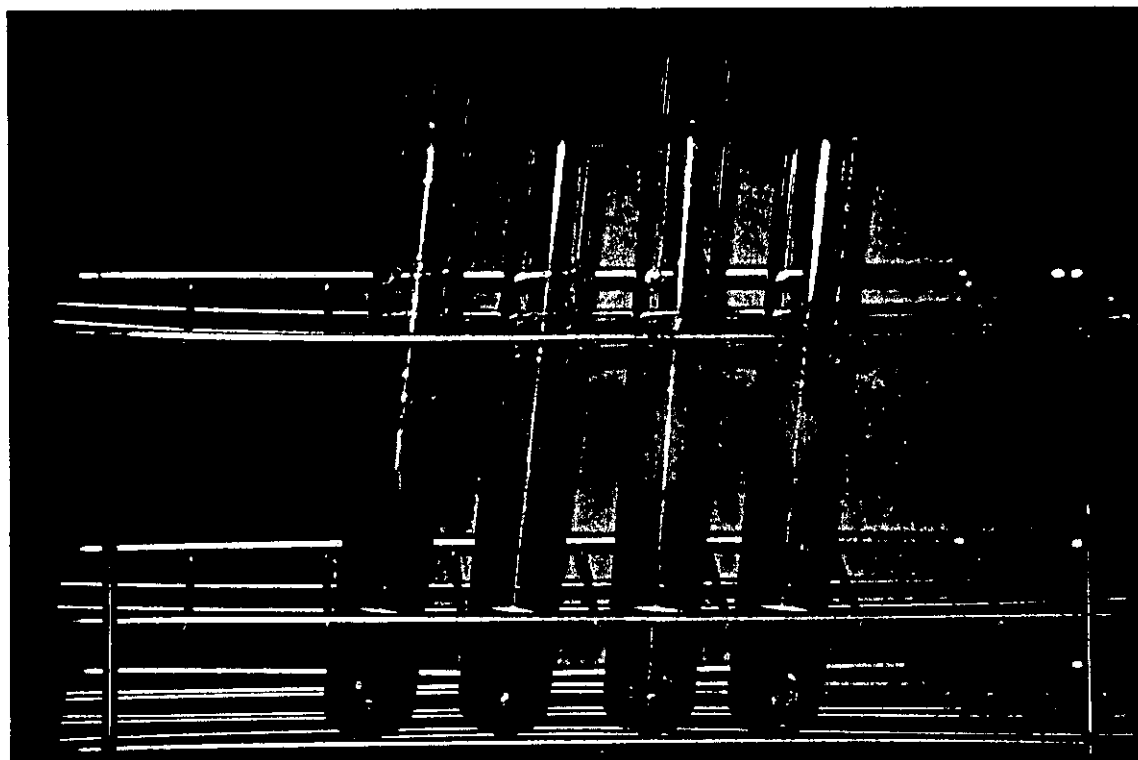
20D	<i>Z. rouxii</i>	+	+	34E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+
20E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+	34E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+
20E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+	34E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+
20E4	<i>Z. rouxii</i>	-	+	35E1(1)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
21D	<i>Z. rouxii</i>	-	+	35E1(2)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
22E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+	35E2(1)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
22E2	<i>Z. rouxii</i>	-	+	35E2(2)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
22E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+	35E3(1)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
22E4	<i>Z. rouxii</i>	+	-	35E3(2)	<i>Z. rouxii</i>	+	+
24E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+	35E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+
24E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+	36E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+
24E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+	36E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+
24E4	<i>Z. rouxii</i>	+	-	36E3	<i>Z. rouxii</i>	+	+
26E1	<i>Z. rouxii</i>	+	+	36E4	<i>Z. rouxii</i>	+	+
26E2	<i>Z. rouxii</i>	+	+				

Medio experimental: Caldo Nutritivo + 600 g/L sacarosa + 0,5 g/L sorbato potásico.

Tabla 14.- Reproducción del olor a "petróleo" por las cepas de levaduras aisladas de materias primas

Cepa	Especie	Olor	Gas	Cepa	Especie	Olor	Gas
27E1(1)	<i>I. orientalis</i>	-	-	28E2	<i>C. glabrata</i>	-	-
27E1(2)	<i>T. delbrueckii</i>	-	-	28E3(1)	<i>C. glabrata</i>	-	-
27E2(1)	<i>I. orientalis</i>	-	-	28E3(2)	<i>C. glabrata</i>	-	-
27E2(2)	<i>T. delbrueckii</i>	-	-	28E4(1)	<i>C. glabrata</i>	-	-
27E3(1)	<i>I. orientalis</i>	-	-	28E4(2)	<i>C. glabrata</i>	-	-
27E3(2)	<i>T. delbrueckii</i>	-	-	28E4(3)	<i>C. glabrata</i>	-	-

Medio experimental: Caldo Nutritivo + 600 g/L sacarosa + 0,5 g/L sorbato potásico.



Fotografía 19.- Reproducción de la formación de gas, tras 5 días de incubación a 28°C, por cepas productoras de olor a "petróleo". De izquierda a derecha, los cultivos corresponden a las cepas 3E y 4E (*D. hansenii*) y 14D, 1E y 24E1 (*Z. rouxii*).

Tabla 15.- Reproducción a "petróleo" por las cepas de levaduras aisladas de otros productos altamente azucarados

Cepa	Especie	Olor	Gas	Cepa	Especie	Olor	Gas
38E1	<i>P. guilliermondii</i>	-	-	39E2	<i>S. octosporus</i>	-	+
38E2	<i>P. guilliermondii</i>	-	-	39E3	<i>S. octosporus</i>	-	+
38E3	<i>P. guilliermondii</i>	-	-	39E4	<i>S. octosporus</i>	-	+
38E4	<i>P. guilliermondii</i>	-	-				

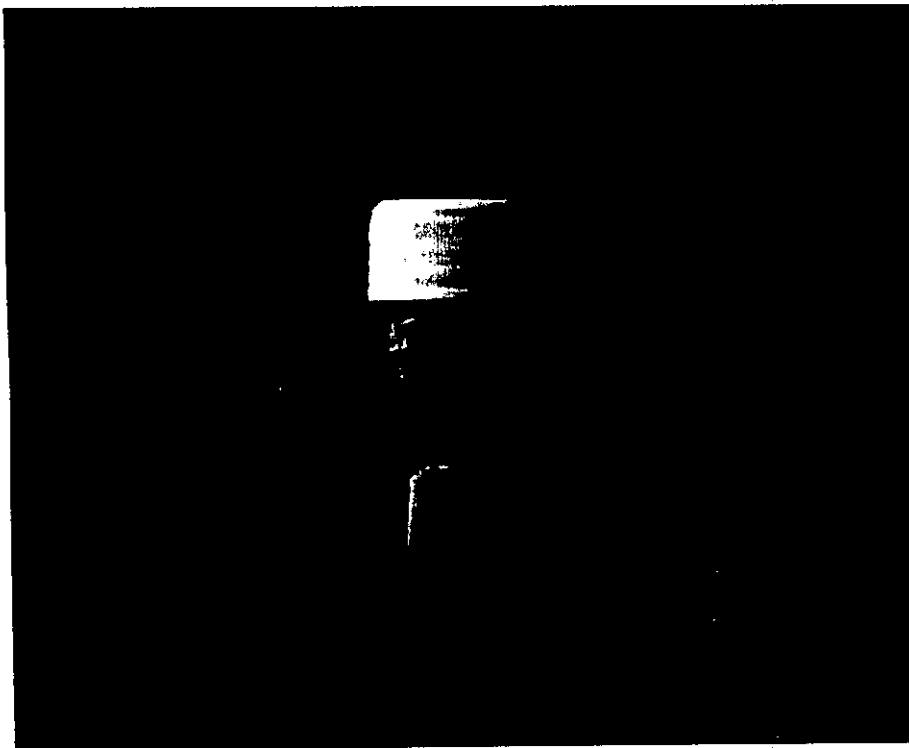
Medio experimental: Caldo Nutritivo + 600 g/L sacarosa + 0,5 g/L sorbato potásico.

Tabla 16.- Reproducción del olor a "petróleo" por los hongos filamentosos aislados de distintas muestras

Cepa	Especie	Olor	Cepa	Especie	Olor
H1	<i>P. chrysogenum</i>	+	H5	<i>P. chrysogenum</i>	+
H2	<i>P. crustosum</i>	+	H6	<i>P. simplicissimum</i>	+
H3	<i>P. chrysogenum</i>	+	H7	<i>A. niger</i>	+
H4	<i>P. chrysogenum</i>	+			

Medio experimental: Caldo Nutritivo + 600 g/L sacarosa + 0,5 g/L sorbato potásico.

IV.3.2.- Reproducción de las licuefacciones puntuales



Fotografía 20.- Reproducción de la licuefacción puntual en pasta de almendra por las cepas de levadura ensayadas. La zona licuada (abajo) corresponde a la inoculación en superficie, y la menos alterada (arriba) a la inoculación en profundidad.

IV.3.2.1.- Reproducción *in situ*. Para la reproducción *in situ* de la alteración, es decir, sobre el propio sustrato -pasta de almendra- se inocularon las cuatro cepas de *Z. rouxii* correspondientes a los primeros aislamientos de la muestra M32, 34E1(1) y 34E1(2), y de la muestra M33, 35E1(1) y 35E1(2). La licuefacción en las porciones de pasta de almendra fue positiva para las cuatro cepas ensayadas, efecto que recoge la Fotografía 20.

IV.3.2.2.- Reproducción en medios experimentales

Tabla 17.- Reproducción en medios de composición similar al sustrato original

Medio	0,1% sorbato	Lectura*
66% (p/p) sacarosa + 34% (p/p) almendra	+	Licuefacción
	-	Licuefacción
1% (p/p) sacarosa + 99% (p/p) almendra	+	Sólo crecimiento
	-	Sólo crecimiento
660 g/L sacarosa + 5 g/L almendra	+	Sólo crecimiento
	-	Sólo crecimiento
66% sacarosa + azul de bromofenol	+	Viraje del indicador
	-	Viraje del indicador
66% sacarosa + rojo congo	+	Viraje del indicador
	-	Viraje del indicador
66% sacarosa + verde de bromocresol	+	Viraje del indicador
	-	Viraje del indicador
66% sacarosa + rojo de metilo	+	Viraje del indicador
	-	Viraje del indicador

* Las cuatro cepas ensayadas -34E1(1), 34E1(2), 35E1(1), 35E1(2)- dieron los mismos resultados.



Fotografía 21.- Efecto del crecimiento de la cepa 34E1(1) de *Z. rouxii* en los medios con 66% de sacarosa + 34% de almendra (p/v) -a la izquierda-, y con 1% de sacarosa y 99% de almendra (p/p) -a la derecha-. En el primer medio no se observa ningún efecto, mientras que en el segundo se aprecian cuatro puntos donde el crecimiento de la levadura ha provocado la pérdida de masa sólida, rodeados de una zona con el mismo aspecto licuado que se aprecia en las Fotografías 2 y 20.

Tabla 18.- Estudio de distintas actividades enzimáticas relacionadas

Medio	% azúcar (p/v)	0,1% sorbato	Lectura (halos)
<i>Chalk agar</i> (acidificación)	5% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
Gorodkova + 5% aceite de almendra (lipolisis)	0,1% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
Agar tributirina (lipolisis)	0,5% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
Base agar tributirina + aceite de almendra (lipolisis)	0,5% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
YMA + 1% gelatina (proteolisis)	1% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
Agar de Frazier (proteolisis)	0,5% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
YMA + 1% almidón (amilolisis)	1% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-
Agar pectina (pectinolisis)	0,5% glucosa	+	-
	66% sacarosa	-	-

IV.4.- CMI de ácido sórbico para cepas seleccionadas**Tabla 19.- CMI en g/L de ácido sórbico para cepas de levadura aisladas de productos de mazapán**

Número de cepa	MIC en 1% (p/v) de glucosa	MIC en 60% (p/v) de glucosa
1E	≤0,5 g/L	1,2 g/L
2E	≤0,5 g/L	0,9 g/L
3E	≤0,5 g/L	0,9 g/L
10E	≤0,5 g/L	1,2 g/L
14D	≤0,5 g/L	0,8 g/L
24E1	≤0,5 g/L	>1,2 g/L
26E1	≤0,5 g/L	>1,2 g/L
32E1	≤0,5 g/L	1,2 g/L

Rango de concentraciones de ácido sórbico ensayadas: 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2 g/L.

IV.5.- Identificación del compuesto responsable del olor a "petróleo"

Como se mencionó en el Apartado III.9 de Material y métodos, Marth *et al.* (1966) describieron por primera vez la capacidad de algunos hongos del género *Penicillium* de descarboxilar el sorbato a 1,3-pentadieno, compuesto con un característico olor a "petróleo", "pintura" o "hidrocarburo", como el detectado en algunas muestras de este trabajo. La Figura 1 muestra el cromatograma del 1,3-pentadieno patrón (1a); el pico corresponde a la inyección de 1 µL del compuesto, cuyo espectro de masas aparece debajo (1b). En la Figura 2 se muestran el cromatograma (2a) y el espectro de masas (2b) correspondientes a la inyección de 1 µL de otro compuesto patrón, isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Tanto el tiempo de retención como la fragmentación m/z del segundo compuesto son coincidentes con los del pentadieno patrón.

Ambos compuestos, como se observa en las Figuras 1a y 2a, poseen un tiempo de retención de 1,5 minutos; la fragmentación m/z , que aparece en las Figuras 1b y 2b, es la siguiente: 27, 39, 53, 67.

Por su parte, las Figuras 3 a 9 muestran los correspondientes cromatogramas (3a a 9a) y espectros de masas (3b a 9b) de los metabolitos presentes en el gas de cabeza de los cultivos de los microorganismos productores del olor a "petróleo" que se indican en cada figura. Los tiempos de retención de los picos del compuesto correspondientes a la cepa representante de *Z. rouxii* -1E- (Figura 3a), *D. hansenii* -3E- (Figura 4a), *S. octosporus* (Figura 5a), *P. chrysogenum* (Figura 6a), *P. crustosum* (Figura 7a), *P. simplicissimum* (Figura 8a) y *A. niger* (Figura 9a) son similares a los de los compuestos patrón. Asimismo, los espectros de masas correspondientes a estos picos se asemejan a los de los patrones, siendo la fragmentación m/z muy similar en todos los casos. Los resultados se confirmaron por comparación con los espectros de masas del 1,3-pentadieno y el isopreno contenidos en la base de datos del programa.

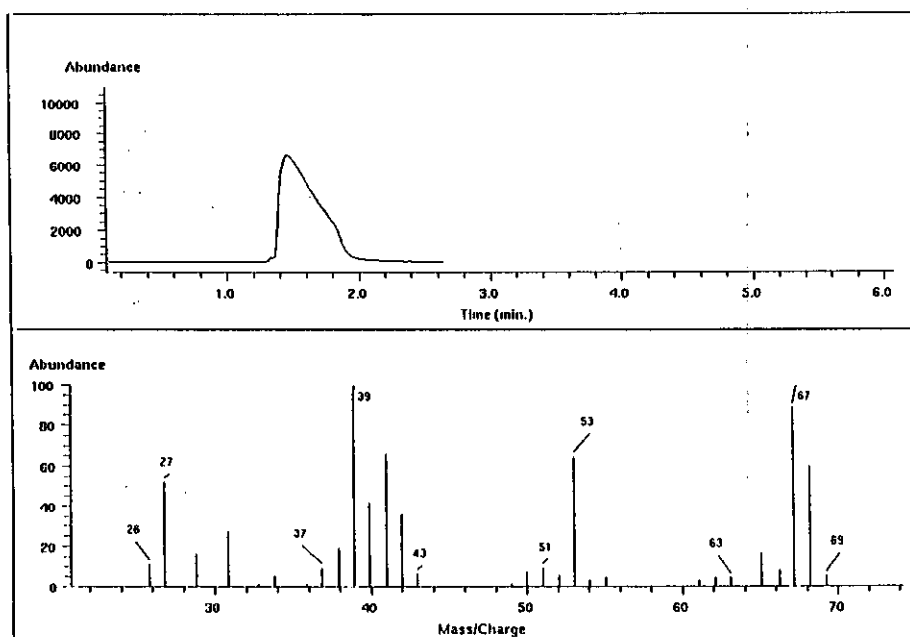


Figura 1

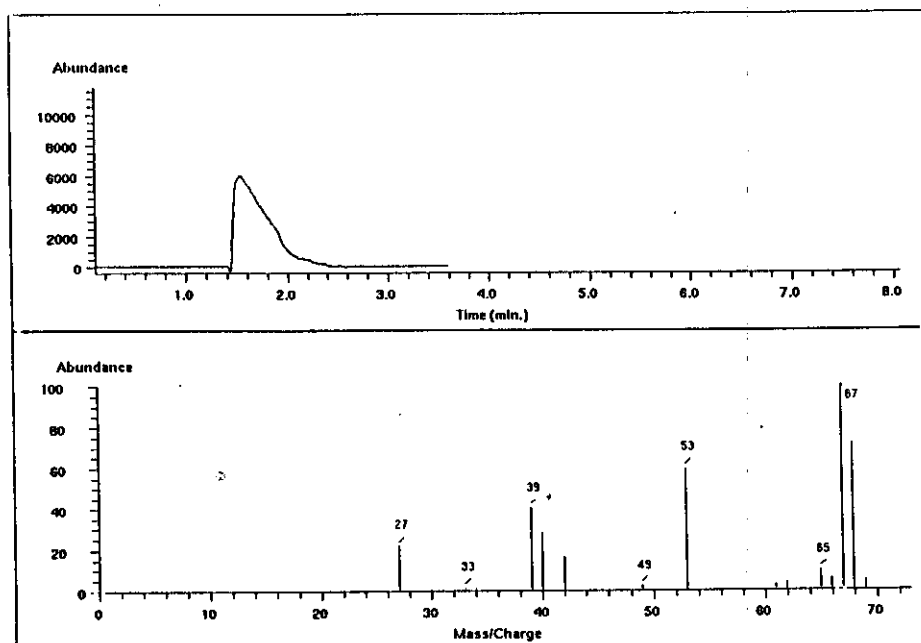


Figura 2

Figura 1.- Cromatograma (a) y espectro de masas correspondientes a la inyección de 1 μ L de 1,3-pentadieno (mezcla de isómeros cis y trans) patrón.

Figura 2.- Cromatograma (a) y espectro de masas correspondientes a la inyección de 1 μ L de isopreno (2-metil 1,3-butadieno) patrón.

Las siguientes figuras representan el cromatograma (a) y espectro de masas obtenidos por la inyección de 1 μ L del gas de cabeza de un cultivo de 4 días en el medio experimental con sorbato de la cepa de hongo o levadura que se indica. El espectro corresponde a los picos cromatográficos de metabolitos cuya fragmentación m/z contenga un ion de valor 67, seleccionado a partir de los espectros de los compuestos patrón.

Figura 3.- Cepa 1E de *Z. rouxii*. Esta figura representa a los cromatogramas y respectivos espectros obtenidos para el resto de cepas de *Z. rouxii*: 2E, 14D, 24E1, 26E1, 32E1, 34E1(1), 34E1(2), 35E1(1) y 35E1(2).

Figura 4.- Cepa 3E de *D. hansenii*. Esta figura representa a los cromatogramas y respectivos espectros obtenidos para el resto de cepas de *D. hansenii*: 4E y 10E.

Figura 5.- Cepa 39E3 (*S. octosporus*).

Figura 6.- Cepa H1 (*P. chrysogenum*). Esta figura representa a los cromatogramas y respectivos espectros obtenidos para el resto de cepas de *P. chrysogenum*: H3, H4 y H5.

Figura 7.- Cepa H2 (*P. crustosum*).

Figura 8.- Cepa H6 (*P. simplicissimum*).

Figura 9.- Cepa H7 (*A. niger*).

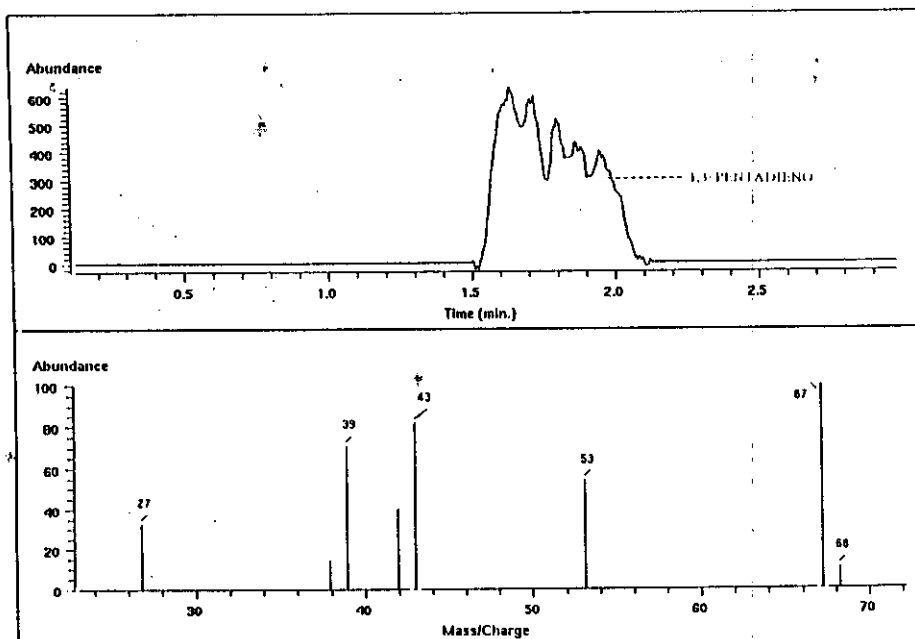


Figura 3

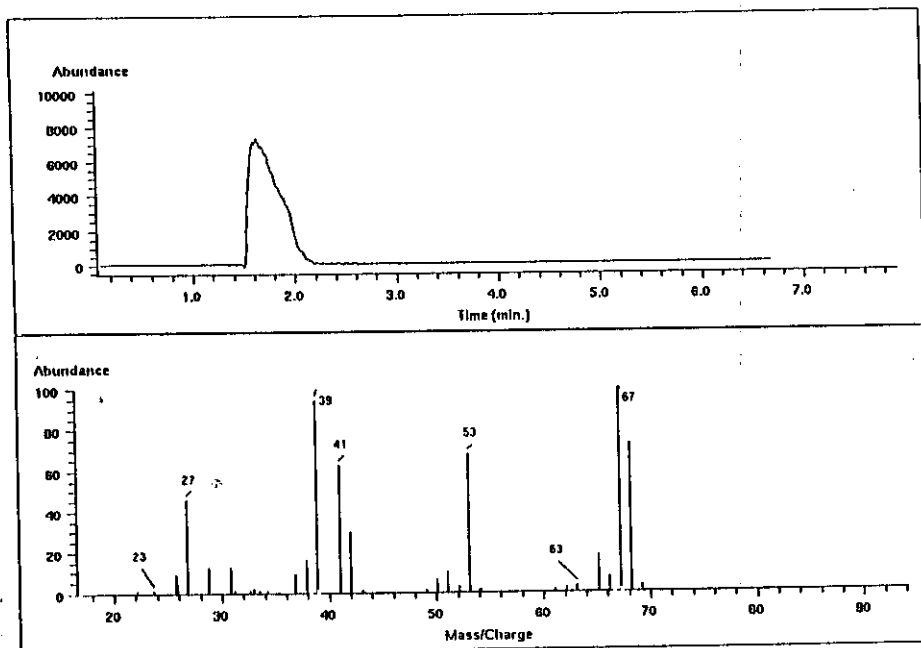


Figura 4

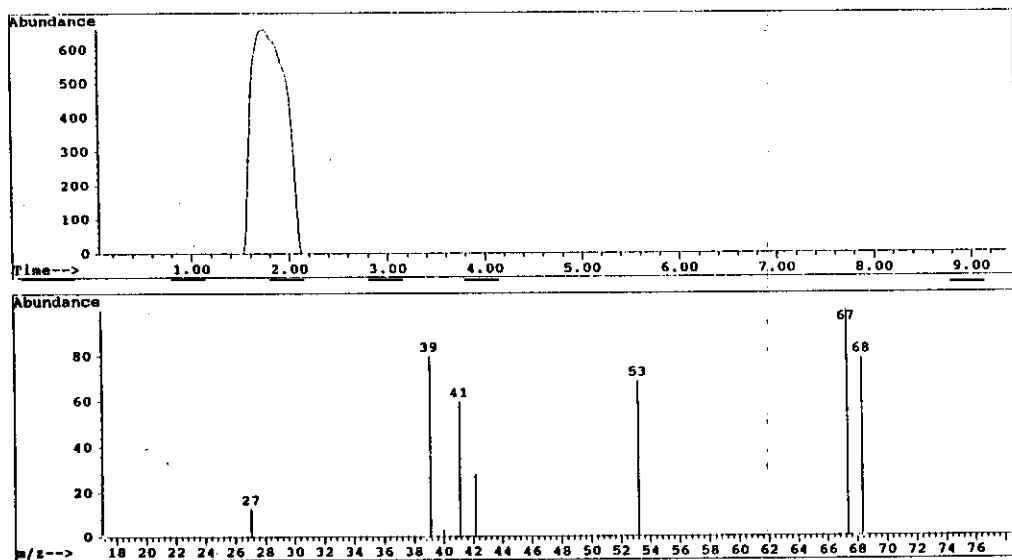


Figura 5

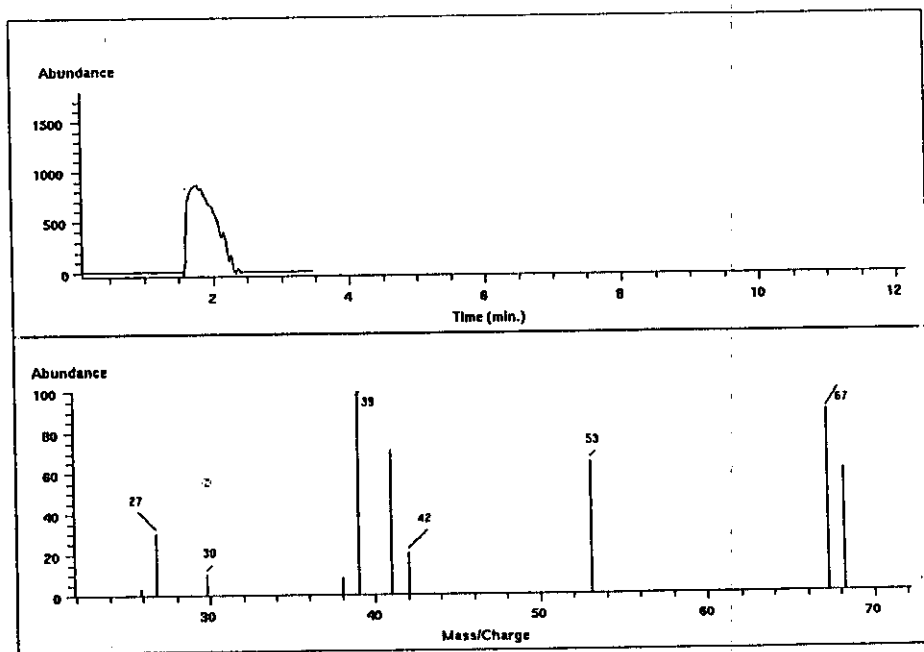


Figura 6

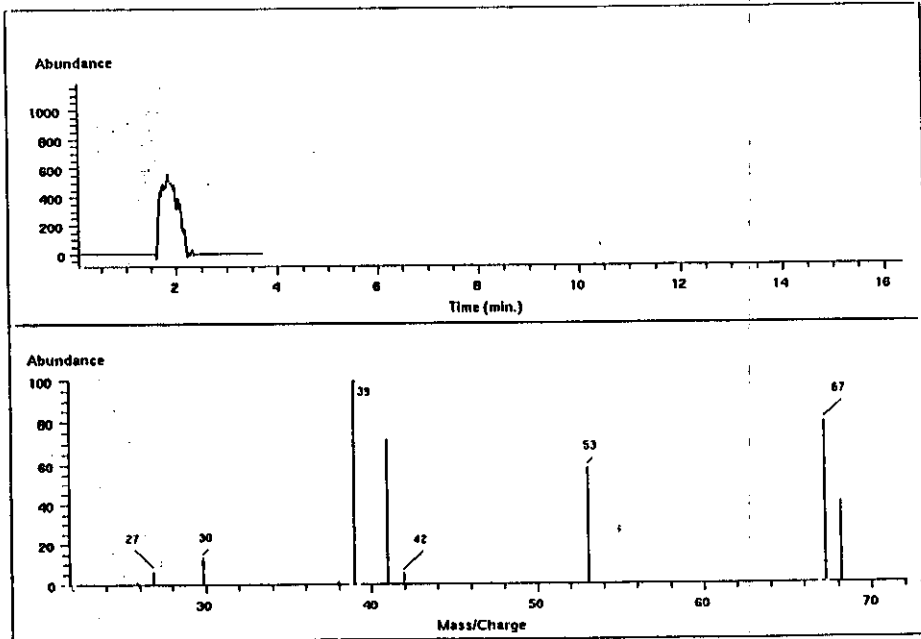


Figura 7

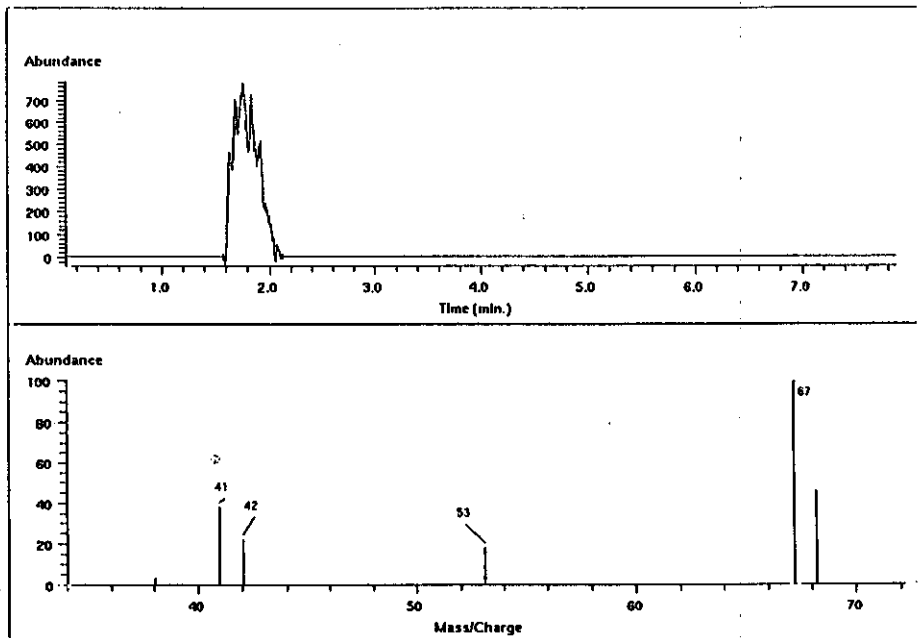


Figura 8

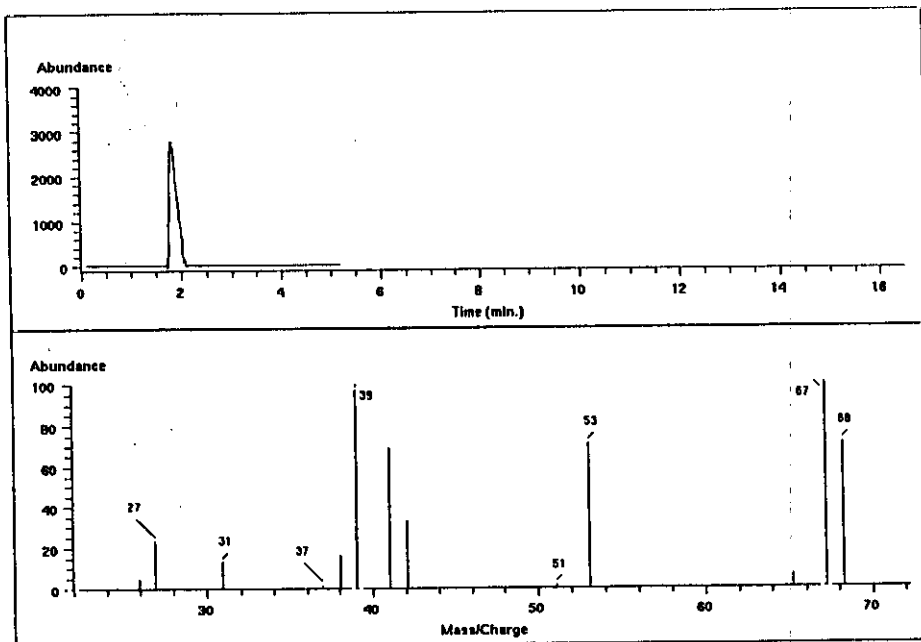


Figura 9

IV.6.- Cuantificación de pentadieno producido a partir de sorbato

IV.6.1.- Cuantificación de sorbato

Para el cálculo de la concentración de sorbato presente en las distintas muestras, se construyó previamente una curva de calibración a partir de las tres diluciones de la solución patrón. La Figura 10 muestra el cromatograma obtenido por la inyección de una de estas diluciones.

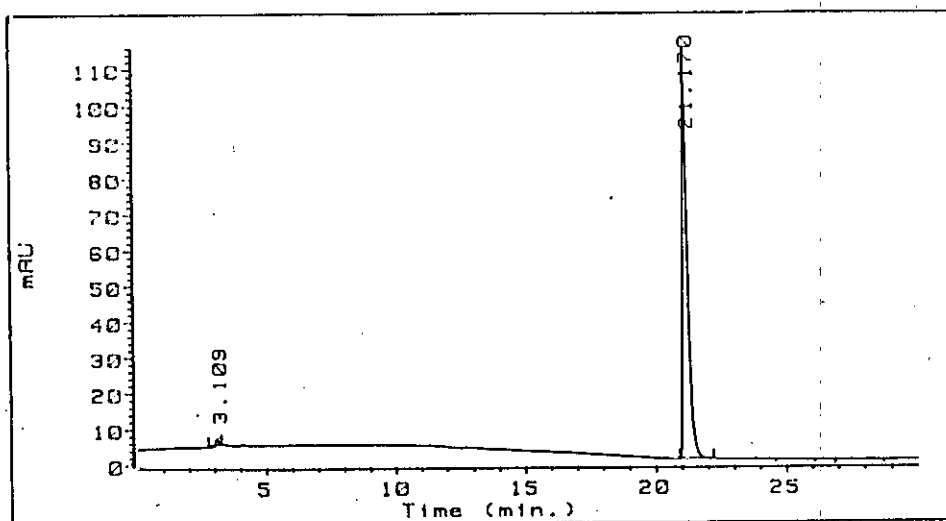


Figura 10. Cromatograma (HPLC) correspondiente a la dilución menos concentrada de la solución patrón de ácido sórbico, 0,008 g/L. El volumen inyectado fue de 20 μ L y la detección espectrofotométrica se llevó a cabo a 264 nm. El pico obtenido presentó un tiempo de retención de 21,17 minutos.

La relación entre las áreas medias calculadas para las tres diluciones y sus respectivas concentraciones dio lugar a una curva de calibración consistente en una recta de regresión definida por la siguiente ecuación:

$$Y = 1,078 \times 10^{-4}X + 3,010 \times 10^{-3},$$

donde:

X = área media del pico obtenida de las dos inyecciones.

Y = concentración de sorbato en g/L.

Desviación estándar (σ) = 0

Varianza (σ^2) = 0

Coefficiente de correlación (r) = 1,00

Coefficiente de determinación (r^2) = 1,00

IV.6.1.1.- Recuperación de sorbato de los medios sin inocular. La concentración de sorbato recuperada de los medios sin inocular se calculó, aplicando la recta de regresión mencionada en el apartado anterior, a partir de las áreas de los respectivos picos cromatográficos. En la Figura 11 aparece el cromatograma obtenido por la inyección de una de estas muestras.

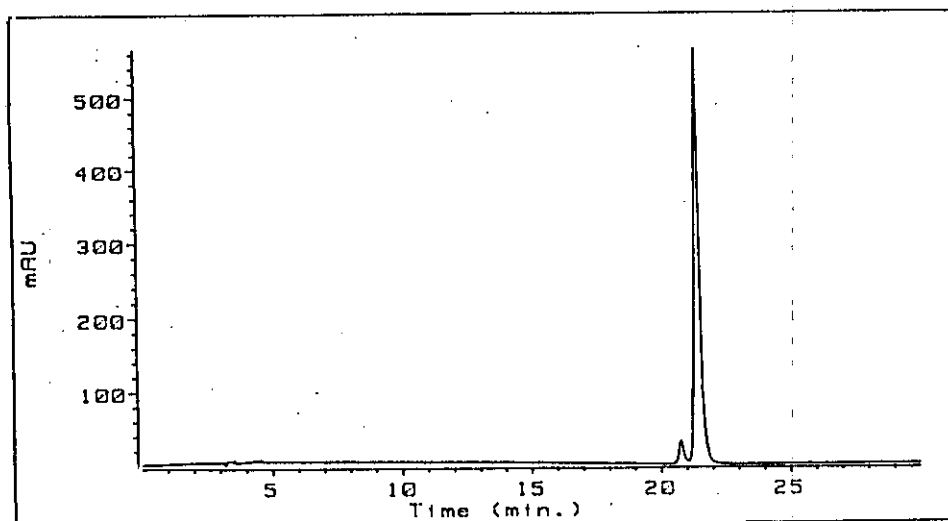


Figura 11. Cromatograma (HPLC) correspondiente a un medio con una concentración añadida de 1 g/L de sorbato potásico. El residuo extraído se resuspendió en 2 mL de metanol y se realizó una nueva dilución 1/100 en el mismo disolvente. El volumen inyectado fue de 20 μ L y la detección espectrofotométrica se llevó a cabo a 264 nm. Se observa la coincidencia en el tiempo de retención del pico principal con el del pico del patrón, así como la aparición de un pico secundario.

Las concentraciones de sorbato recuperadas a partir de los distintos medios, así como los porcentajes de recuperación calculados a partir de las mismas, se recogen en la Tabla 20.

Concentración inicial (g/L)	Concentración recuperada (g/L)	Porcentaje de recuperación (%)	Coefficiente de recuperación (%)
0,25	0,20	80,66	
0,50	0,44	88,30	84,24
1,00	0,83	84,24	

Tabla 20. Determinación de sorbato a partir de tres concentraciones conocidas. Los valores consignados corresponden a la media de dos inyecciones de HPLC. De las concentraciones de sorbato calculadas respecto de las esperadas se obtuvieron tres porcentajes de recuperación, uno para cada concentración inicial de sorbato. La media de los tres porcentajes (coeficiente de recuperación) es el valor aplicado a las concentraciones de sorbato determinadas en las muestras inoculadas.

IV.6.1.2.- Determinación de sorbato en los medios inoculados. La cuantificación del sorbato presente en los medios inoculados se realizó según la metodología anterior. En las Figuras 12 y 13 se muestran los cromatogramas obtenidos de dos de estos medios inoculados, respectivamente, con *Z. rouxii* y *D. hansenii*, siendo la concentración inicial de sorbato de 1 g/L en ambos casos.

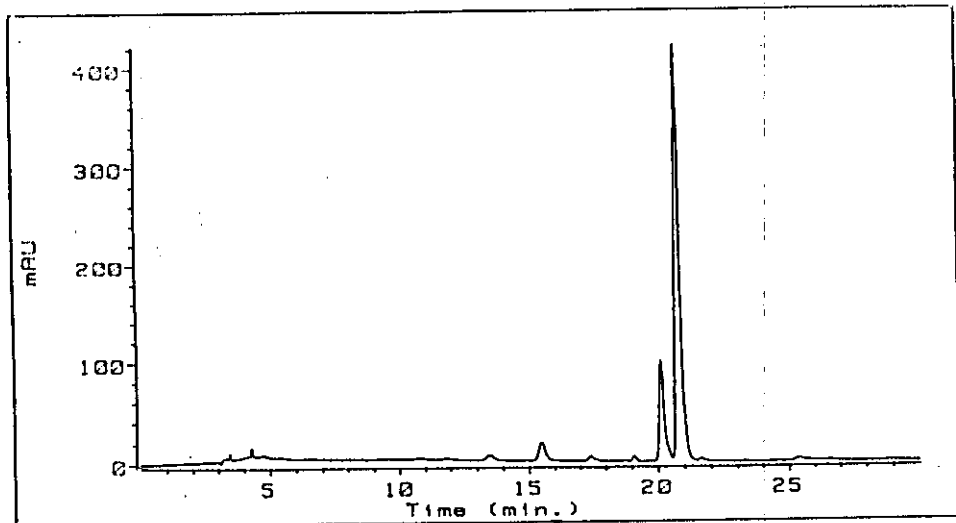


Figura 12

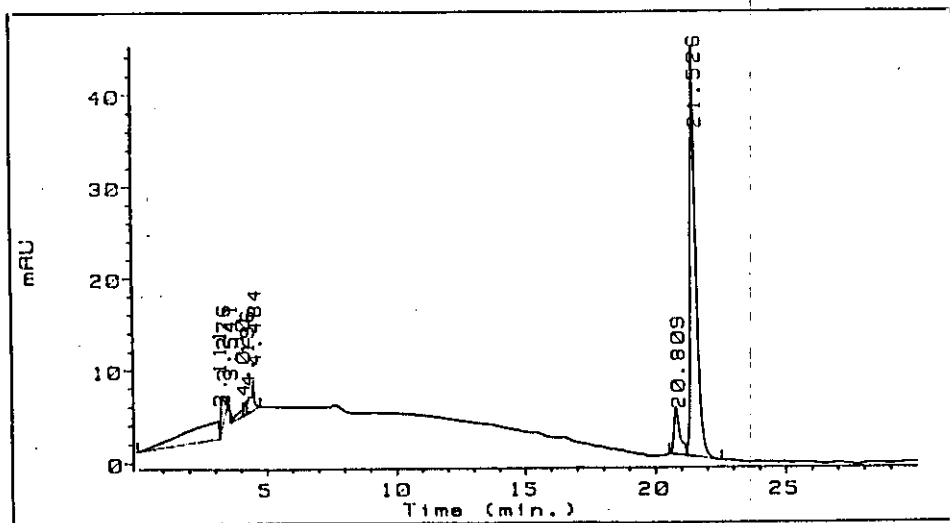


Figura 13

Figuras 12 y 13. Cromatograma HPLC correspondiente al ácido sórbico recuperado tras la incubación durante cuatro días con la cepa 1E de *Z. rouxii* (Figura 12) o 3E de *D. hansenii* (Figura 13). El extracto se resuspendió en 2 mL de metanol, de los que se inyectó un volumen de 20 μ L y la detección espectrofotométrica se llevó a cabo a 264 nm.

En la Tabla 21 se recogen las concentraciones de sorbato recuperadas de los distintos medios incubados, calculados a partir de las áreas de sus picos respectivos.

Concentración de sorbato (g/L)		
Concentración inicial	Concentración final	
	<i>Z. rouxii</i> (Cepa 1E)	<i>D. hansenii</i> (Cepa 3E)
0,25	$1,60 \times 10^{-3}$	$3,18 \times 10^{-3}$
0,50	$3,14 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-3}$
1,00	$9,85 \times 10^{-3}$	$5,23 \times 10^{-3}$

Tabla 21. Cuantificación de sorbato en los medios de cultivo después de cuatro días de incubación de los mismos con *Z. rouxii* (cepa 1E) o *D. hansenii* (cepa 3E) (concentración final). Los valores consignados representan la media de los triplicados incubados para cada concentración y de las inyecciones de HPLC por duplicado, tras aplicar el coeficiente de recuperación calculado como se indica en la Tabla 20.

IV.6.2.- Cuantificación de pentadieno

La relación entre los volúmenes de pentadieno patrón inyectados en los viales de medio de cultivo estéril y su respectiva abundancia máxima medida del ion 67 en el espectro de masas dio lugar a una curva de calibración consistente en una recta de regresión definida por la siguiente ecuación:

$$Y = 376,68 X - 618,647,$$

donde:

X = volumen de pentadieno inyectado en μL .

Y = abundancia máxima del ion 67.

Coefficiente de correlación (r) = 0,927533

Coefficiente de determinación (r^2) = 0,860317

Mediante esta recta de regresión, la abundancia máxima del ion 67 medida en cada muestra se transformó en volumen de pentadieno producido, valores que recogen las Tablas 22 y 23.

Z. rouxii (cepa 1E)	Volumen de Pentadieno producido (μL)		
	Concentración inicial de sorbato (g/L)		
	Tiempo (días)	0,25	0,50
Día 0	0	0	0
Día 1	0	0	0
Día 2	3,12	3,85	5,00
Día 3	3,85	5,96	8,67
Día 4	3,91	7,27	11,11

D. hansenii (cepa 3E)	Volumen de Pentadieno producido (μL)		
	Concentración inicial de sorbato (g/L)		
	Tiempo (días)	0,25	0,50
Día 0	0	0	0
Día 1	0	0	0
Día 2	2,26	3,43	10,89
Día 3	2,42	3,55	12,58
Día 4	2,82	4,85	19,44

Tablas 22 y 23. Resultados de la determinación cuantitativa de la producción de 1,3-pentadieno por la cepa 1E de *Z. rouxii* (Tabla 22) y 3E de *D. hansenii* (Tabla 23). El primer análisis (día 0) se realizó justo después de la inoculación de la levadura. Los valores de la tabla representan la media de las tres determinaciones para cada concentración.



IV.6.3.- Recuentos celulares

Z. rouxii (cepa 1E)

Recuentos iniciales (UFC/mL)	Concentraciones de sorbato (g/L)	Recuentos finales (UFC/mL)	Varianza
4,0 x 10 ⁵	0,00	5,0 x 10 ⁶	5,33333
	0,25	3,6 x 10 ⁶	
	0,50	4,0 x 10 ⁶	
	1,00	4,0 x 10 ⁶	

Tabla 24. Recuento de células de *Z. rouxii* (cepa 1E) en los medios con distintas concentraciones de sorbato antes de la incubación (recuentos iniciales) y después de 4 días de incubación de los mismos (recuentos finales). En el caso de los medios con 0,25, 0,50 y 1,00 g/L de sorbato, los valores corresponden a la media de los recuentos de los triplicados; junto a la media, aparece la varianza de los tres valores.

Test de ANOVA para el conjunto de recuentos finales:

$$F = 0,14286$$

$$p = 0,93057$$

Para un nivel de significación $\alpha = 0,05$, las medias NO SON significativamente diferentes.

***D. hansenii* (cepa 3E)**

Recuentos iniciales (UFC/mL)	Concentraciones de sorbato (g/L)	Recuentos finales (UFC/mL)	Varianza
1,5 x 10 ⁶	0,00	7,5 x 10 ⁷	
	0,25	1,5 x 10 ⁷	
	0,50	1,0 x 10 ⁷	
	1,00	1,6 x 10 ⁷	

Tabla 25. Recuento de células de *D. hansenii* (cepa 3E) en los medios con distintas concentraciones de sorbato antes de la incubación (recuentos iniciales) y después de 4 días de incubación de los mismos (recuentos finales). En el caso de los medios con 0,25, 0,50 y 1,00 g/L de sorbato, los valores corresponden a la media de los recuentos de los triplicados; junto a la media, aparece la varianza de los tres valores.

Test de ANOVA para el conjunto de recuentos finales:

$$F = 50,2399$$

$$p = 1,20977 \times 10^{-4}$$

Para un nivel de significación $\alpha = 0,05$, las medias SON significativamente diferentes.

Test de ANOVA excluyendo el valor (recuento) correspondiente al medio sin sorbato:

$$F = 1,12315$$

$$p = 0,38519$$

Para un nivel de significación $\alpha = 0,05$, las medias NO SON significativamente diferentes.

V.- DISCUSIÓN

V.1.- Caracterización de microorganismos aislados

Todas las bacterias aisladas (B1-B5 de M32, B6-B10 de M33 y B11-B17 de M35, respectivamente) fueron bacilos grampositivos aerobios y esporulados, con espora central no deformante, que se pueden identificar como *Bacillus sp.*. Estas bacterias, probablemente presentes en las muestras en forma esporulada debido a las condiciones adversas de a_w , como se refirió en la Introducción (Apartado I.2), no son capaces de germinar y multiplicarse, y por tanto no contribuyen al deterioro del producto, ya que no reprodujeron ni el olor a "petróleo" ni la licuefacción puntual, por lo que su presencia en estas muestras no será tenida en cuenta en los siguientes apartados.

V.1.1.- Levaduras

Antes de comenzar la descripción de la especies aisladas de cada uno de los sustratos, cabe mencionar que todas estas especies pertenecen a los Ascomicetos, y no se aisló ninguna levadura perteneciente a los Basidiomicetos.

En la Tabla 8 se recogen las levaduras aisladas a partir de las muestras indicadas de mazapán y productos relacionados, muestras que se describieron previamente en la Tabla 4 de Material y métodos.

Las muestras M1 a M5 (pasteles de yema) y M6 a M10 (pasteles de gloria), procedentes de devoluciones, se almacenaron a temperatura ambiente durante dos años antes de su análisis. A pesar de mantenerlas en enriquecimiento un largo período de tiempo (30 días), sólo se recuperaron levaduras en cuatro muestras de las diez analizadas (M1, M6, M7 y M9). Lo más destacable es que aunque el enriquecimiento se realizó simultáneamente en YMB, con 10 g/L de glucosa, e YMBG, con 330 g/L de glucosa, el aislamiento de las cepas tuvo lugar sólo a partir de YMBG. De los resultados obtenidos del análisis de estas muestras antiguas se derivan las siguientes consideraciones. Para que la alteración de un producto se haga evidente, la población inicial que lo contaminó debe multiplicarse hasta alcanzar cierta magnitud, que en mazapán suele ser del orden de 10^6 células de levadura

(UFC)/g (Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987; Tudor y Board, 1993). A medida que la levadura se desarrolla, el sustrato se va transformando en un entorno adverso por pérdida de nutrientes y humedad, acumulación de metabolitos, etc., con lo que se produce un descenso en el número y viabilidad de la población de levaduras y la presencia de éstas puede pasar desapercibida al no poder recuperarse en medios tradicionales. Este efecto se debe en parte al **choque osmótico** que supone el paso desde un sustrato con elevada presión osmótica ejercida por la presencia en elevada cantidad de un soluto (azúcar o cloruro sódico) a un medio donde la concentración de soluto es drásticamente menor (El Halouat y Debevere, 1996). Parece además que las células de levadura en fase estacionaria son más sensibles al choque osmótico (Jermini *et al.*, 1987).

El empleo de medios de cultivo y diluyentes con elevada concentración de azúcar se ha convertido en una metodología muy extendida (Restaino *et al.*, 1983; Deak y Beuchat, 1996). Resulta especialmente útil para la recuperación de levaduras que por su bajo número y/o estado fisiológico necesitan medios que reproduzcan lo más fielmente posible el entorno en el que se encuentran, pues se reduce el efecto del choque osmótico (Deak y Beuchat, 1996; El Halouat y Debevere, 1996). Las concentraciones de azúcar incorporadas a los medios de cultivo para este fin son diversas: 2, 40 ó 60% (p/v) de glucosa (Windisch *et al.*, 1978a); sacarosa, glucosa o fructosa en concentración $\leq 60\%$ (p/v) (Windisch *et al.*, 1978b), aunque el crecimiento en medios con sacarosa fue menos abundante que en medios con glucosa o fructosa; 40% (p/p) de sacarosa, a_w 0,96 (El Halouat y Debevere, 1996); 50% (p/p) de glucosa (Jermini *et al.*, 1987); 60% (p/p) de glucosa, a_w 0,82 (Zimmerly, 1980); 30, 50 y 60% (p/p) de glucosa para medios de enriquecimiento en líquido y de aislamiento en sólido (Taing ok y Hashinaga, 1997).

Los valores de a_w conseguidos por la adición de distintas concentraciones de glucosa a un medio base, según El Halouat y Debevere (1996), se refieren en la Tabla 26.

Tabla 26.- Valores de a_w obtenidos por la adición de distintas concentraciones de glucosa a una solución acuosa al 0,5% (p/p) de extracto de levadura, con y sin agar.

% Glucosa	30	40	45	50	55	60	65	70
a_w (líquido)	0,96	0,94	0,92	0,90	0,88	0,84	0,80	0,76
a_w (sólido)	-	0,93	0,92	0,90	0,87	0,83	0,79	0,74

Modificado de El Halouat y Debevere (1996).

Golden y Beuchat (1990, 1992b), para mejorar la detección de levaduras osmófilas en productos azucarados, emplean medios generales (YMA, YMB) a los que complementan con glucosa, sacarosa o NaCl. Cuando se emplea YMB como medio de crecimiento la a_w es de 0,99, mientras que los productos altamente azucarados tienen una a_w reducida, como se muestra en la Tabla 2 de la Introducción. Golden y Beuchat (1992b), para reducir la a_w hasta 0,93, incorporan al YMB distintos solutos, cada uno en su correspondiente concentración (p/v): glucosa 33%, sacarosa 45%, o NaCl 10%. La adición de un 1,5% de agar para obtener los correspondientes medios sólidos no varió de forma perceptible la a_w , como también se observa en la Tabla 26, aunque Tilbury (1976) refiere que para un mismo valor de a_w el contenido en agua total es mayor en líquido que en sólido, ya que la a_w mínima necesaria para el crecimiento de levaduras osmotolerantes es más baja en medios líquidos que en sólidos.

Yarrow (1998) recomienda, como medios sólidos para el aislamiento directo de levaduras osmotolerantes y osmófilas a partir de alimentos, medios como YPG o YMA que contengan de 30 a 50% (p/v) de glucosa. Estos medios, con las mismas concentraciones de azúcar, pueden emplearse en líquido para el enriquecimiento de los cultivos.

Para procesar las muestras de productos altamente azucarados contaminados con levaduras, es recomendable su homogeneización directa en caldo enriquecido con azúcar (Jermini *et al.*, 1987; El Halouat y Debevere, 1996; Taing ok y Hashinaga, 1997). Cuando además se quieren realizar recuentos, se debe realizar la serie de diluciones decimales en

un diluyente ajustado a un valor bajo de a_w , añadiendo 40 ó 50% de glucosa (Tilbury, 1976; Deak y Beuchat, 1996); independientemente del soluto que reduce la a_w en el sustrato de origen, Golden y Beuchat (1992b) recomiendan el empleo de YMB suplementado con glucosa, y luego sembrar en el correspondiente medio sólido que contenga glucosa, sacarosa o NaCl (33, 45 ó 10% p/v, respectivamente). Cuando el soluto empleado en el medio sólido es la glucosa, se favorece la recuperación de las levaduras.

Por tanto, los medios de cultivo con alta concentración de azúcar son recomendables para la recuperación de levaduras osmotolerantes porque constituyen un medio apropiado de enriquecimiento selectivo para las mismas, y porque reducen la pérdida de viabilidad debida al choque osmótico (Jermini *et al.*, 1987). Los resultados consignados en la Tabla 8 confirman la utilidad de emplear medios de cultivo que reproduzcan lo más fielmente posible las condiciones del sustrato original, en este caso con a_w disminuida. Así, el medio YMBG permitió recuperar levaduras que, debido a las condiciones de tiempo y conservación de las muestras, debían encontrarse dañadas y/o en bajo número.

Respecto al análisis de la muestra M11 (pan de Cádiz), puesto que se realizó el mismo año de su elaboración y por tanto la aparición de la alteración era reciente, las levaduras se pudieron recuperar por aislamiento directo mediante métodos tradicionales, así como por métodos de enriquecimiento. Al analizar por separado distintas porciones de esta muestra (M11a-M11d), a partir del relleno inferior (M11c) sólo se aislaron levaduras a partir de YMBG, lo que indica que estas levaduras estaban en bajo número y sólo pudieron recuperarse en las condiciones de a_w más favorables.

Un hecho a destacar es el análisis de las muestras M12 a M16, de pasteles de yema: aunque las muestras M13-M15 no estaban alteradas, se incluyeron en esta tabla junto con M12 Y M16, que sí presentaban la alteración característica, por pertenecer al mismo lote de fabricación. Como era de esperar, de las muestras alteradas se aislaron levaduras, mientras que de las no alteradas no se aisló ninguna; el aspecto más interesante es conocer por qué ciertos productos resultan finalmente alterados y otros no, estando confeccionados ambos con las mismas materias primas y siendo sometidas al mismo proceso de fabricación hasta su envasado. Las posibles causas de esta diferencia se discutirán más adelante.

En la Tabla 8 se observa que del medio de enriquecimiento YMBG, en el cual se mantuvieron en incubación las muestras anteriores -además del aislamiento directo realizado de la muestra M11-, se recuperaron levaduras ya en la primera resiembra, a los tres días de incubación (E1) de las muestras M11, M12 y M16. Sin embargo, fueron necesarios 7 días de incubación de las muestras M6 y M9, y 14 días de M1 y M7 para aislar levaduras del medio de enriquecimiento con 330 g/L de glucosa. Esta diferencia también sugiere que en las muestras antiguas las levaduras se encontraban dañadas y por eso tardaron más en desarrollarse.

La identificación de las especies de levadura aisladas de productos alterados de muestras de mazapán se muestra también en la Tabla 8. Como puede observarse, la especie que se aísla mayoritariamente, con 36 aislamientos de un total de 39 cepas, corresponde a *Z. rouxii*. Esta especie, como ya se refirió en la Introducción, es la que se aísla con mayor frecuencia de alimentos altamente azucarados, pero además los estudios realizados sobre muestras de mazapán alterado apuntan a la levadura *Z. rouxii* como principal agente causante (Windisch, 1969; Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987); los efectos de esta alteración se deben fundamentalmente a la actividad fermentativa de esta levadura (Blaschke-Hellmessen y Teuschel, 1970; Seiler, 1977; Tudor y Board, 1993). Sin embargo, aunque en mucha menor proporción (3 aislamientos de 39), también se ha aislado otra especie de levadura, *D. hansenii*, que no es fermentativa.

Parece probable que, como señala Windisch (1969), cuando *Z. rouxii* contamina el mazapán, la distribución sea desigual, por lo que habrá muestras contaminadas y otras no, y puede ser necesario examinar un amplio número de muestras para detectar esta contaminación. En mazapán sin alterar, la incidencia de levaduras es escasa o nula, y la presencia de *Z. rouxii* es rara; sin embargo, una vez que se ha producido la contaminación de una muestra, *Z. rouxii* se desarrolla (profusamente) en la masa de mazapán, a temperatura entre 15-25°C (Blaschke-Hellmessen y Teuschel, 1970), teniendo lugar la alteración perceptible del producto. Esta presencia o ausencia de *Z. rouxii* en el mazapán, así como su capacidad de propagarse en el mismo, pueden explicar que, dentro de un mismo lote, las muestras M12 y M16 resultaron alteradas y M13-M15 no.

Z. rouxii es una de las levaduras osmotolerantes mejor conocidas, aunque existe cierta diversidad dentro de la especie respecto a la a_w mínima tolerada (El Halouat y Debevere, 1997). Como ya se refirió en el Apartado I.2.1 de la Introducción, es capaz de producir y acumular intracelularmente polioles como solutos compatibles, lo que permite a cepas de esta especie crecer en sustratos con un valor de a_w tan bajo como 0,63. Algunas cepas de *Z. rouxii* son además halotolerantes, dependiendo de su origen, aunque la a_w en este caso debe ser mayor (Tokuoka e Ishitani, 1991).

D. hansenii es una especie de levadura conocida por su elevada tolerancia a la sal (Deak y Beuchat, 1996), aunque también es capaz de crecer en alimentos altamente azucarados; de hecho, también se aísla de estos últimos, pero en menor proporción que *Z. rouxii* (Jermini *et al.*, 1987; Praphailong y Fleet, 1997). Aunque se considera que el mecanismo de tolerancia al azúcar es distinto del de tolerancia a la sal (Tokuoka e Ishitani, 1991; Deak y Beuchat, 1996; Taing ok y Hashinaga, 1997), incluso el mecanismo de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa puede ser diferente (Tokuoka e Ishitani, 1991; Deak y Beuchat, 1996), la a_w mínima necesaria para el crecimiento de *D. hansenii* en medios con sal y en medios con distintos azúcares es similar, aproximadamente de 0,83 (ICMSF, 1991; Tokuoka e Ishitani, 1991). A pesar de ser *Z. rouxii* el principal causante de deterioro en el mazapán, *D. hansenii* también es responsable de la alteración en productos realizados a base del mismo, como los pasteles de gloria (muestras M6 y M7) que aparecen en la Tabla 4. Los valores de a_w del mazapán oscilan entre 0,67-0,79 y 0,75-0,80, según el autor -datos que aparecen en la Tabla 2 de la Introducción (Apartado I.2)-, por lo que el crecimiento de *D. hansenii* estaría en principio restringido, aunque la capacidad de tolerar elevadas concentraciones de azúcar varía de una cepa a otra (Windisch, 1969). Así, Praphailong y Fleet (1997) hacen referencia a cepas de *D. hansenii* capaces de crecer en presencia de 60-70% (p/p) de sacarosa. Es importante mencionar aquí de nuevo el fenómeno de adaptación al azúcar referido en el Apartado I.2.1 de la Introducción, por el cual la preincubación de las levaduras en presencia de un azúcar disminuye la a_w para el posterior crecimiento en el mismo azúcar. Sin embargo, también cabe destacar que la presencia de relleno -en este caso boniato confitado-, con una humedad aproximada de un 29% (Casas *et al.*, 1996), puede incrementar el contenido en agua de la masa de mazapán adyacente, alcanzándose un valor de a_w más favorable para el desarrollo de *D. hansenii*.

La Tabla 8 también recoge las cepas de levaduras aisladas e identificadas de productos finales sin alterar. De las cuatro muestras analizadas, las especies de levaduras identificadas a lo largo del período de enriquecimiento son *S. cerevisiae* (29E1-29E4 de la muestra M28 y 30E2(1)-30E4 de M29), *L. elongisporus* (30E1 de M29 y 33E1(1)-33E4 de M31) y *Z. rouxii* (32E1-32E4 de M30), entre las cuales sólo *Z. rouxii* es una de las especies responsables del deterioro de productos finales, como se ha discutido anteriormente.

El perfil taxonómico -tanto fisiológico como morfológico- de algunas cepas incluidas como *L. elongisporus* (33E1(1), 33E2(1) y 33E2(2)), identificadas mediante el programa informático como *D. hansenii*, difiere sensiblemente del de las cepas de *D. hansenii* causantes de alteraciones (3E, 4E, 10E) y se asemeja más al de las cepas de *L. elongisporus* (30E1, 33E1(2), 33E3 y 33E4). Este conjunto de cepas fue finalmente asignado a la segunda opción mostrada por el programa informático, *L. elongisporus*, por varias razones. En términos morfológicos, las células son más irregulares que las cepas de *D. hansenii* típicas -3E, 4E y 10E-, como se aprecia comparando las Fotografías 15 y 10; asimismo, la presencia de un pseudomicelio muy desarrollado es excepcional en las especies de *D. hansenii* (Yarrow, 1984; Barnett *et al.*, 1990); y la fácil detección de esporas en las cepas típicas de *D. hansenii*, como se discutirá más adelante, contrasta con la ausencia total de estas formaciones en las cepas consideradas como *L. elongisporus*.

En términos fisiológicos, el hecho más destacable es que, pese a haber sido aisladas de productos de mazapán con sorbato, al igual que las cepas de *D. hansenii*, las cepas identificadas como *L. elongisporus* no reprodujeron en ningún caso las alteraciones estudiadas para las primeras. Por tanto, en este caso la correcta taxonomía de este conjunto de levaduras no es crucial para este estudio, ya que su presencia en los sustratos de origen no produjo ningún efecto negativo sobre los mismos. En cualquier caso, estas cepas de identificación incierta son un claro ejemplo de la utilidad de las técnicas moleculares para la identificación de levaduras, descritas en el Apartado I.4 de la Introducción. En este sentido, cabe destacar que, mediante la comparación de ADN_r, se ha determinado que *L. elongisporus* presenta una significativa asociación filogenética con especies como *D. hansenii* o *C. guilliermondii* (Cai *et al.*, 1996).

La a_w mínima para el crecimiento de *S. cerevisiae* se sitúa generalmente alrededor de 0,90 (ICMSF, 1991), por lo que no se la considera osmotolerante ni, como en este caso, capaz de producir alteración visible. Sin embargo, sí existen referencias de cepas osmotolerantes de *S. cerevisiae* capaces de crecer a un valor de a_w de 0,75, en miel, fruta confitada, pasas, o productos de confitería (Deak y Beuchat, 1996).

Una vez más, cabe hacer mención de la utilidad del enriquecimiento en un medio con elevada concentración de azúcar -YMBG-, que permite recuperar levaduras en un número suficientemente bajo como para producir deterioro, pero que pueden proliferar en el sustrato y llegar a desarrollar la alteración, en este caso de la muestra M30 (pasteles de yema, ver Tabla 4 de Material y métodos). Además, este procedimiento permitió aislar dos especies de levaduras distintas a partir de una misma muestra; en el análisis de la muestra M29, la levadura identificada en el primer aislamiento -*L. elongisporus*- fue distinta a las identificadas en aislamientos posteriores -*S. cerevisiae*-, lo que implica que utilizando métodos de aislamiento de levaduras menos prolongados la presencia de levaduras en menor número o de crecimiento más lento que otras cepas podría pasar inadvertida.

Por último, en la Tabla 8 se detalla el análisis de dos muestras de pasta de almendra, M32 y M33, con licuefacciones puntuales y olor a "petróleo". Asimismo, se recoge la identificación de las cepas de levadura aisladas de turrón de frutas con olor y sabor a "petróleo" (M35). La levadura aislada tras el período de incubación fue en los tres casos la misma, *Z. rouxii*. El agente responsable es, por tanto, el mismo que en otros productos a base de mazapán, y la reproducción de los efectos será discutida más adelante.

En la Tabla 9 se recoge la identificación de las levaduras aisladas de distintos ingredientes. Es importante mencionar que, de todas las materias primas y productos intermedios analizados (ver Tabla 5 de Material y métodos), sólo se aislaron levaduras de las muestras de almendras (M22 y M23). Este resultado concuerda en principio con las observaciones de Windisch *et al.* (1978a y b), que consideran que las levaduras osmotolerantes responsables de la fermentación del mazapán son introducidas en la fábrica por las almendras. Sin embargo, estos autores no detectan estas levaduras cuando las almendras que analizan están peladas y blanqueadas, siendo esta última forma en la cual

se recibieron en la fábrica las almendras que se analizaron para este trabajo. De hecho, se puede observar que las especies encontradas (*I. orientalis*, *T. delbrueckii* y *C. glabrata*) no son las mismas que se identifican como responsables de las alteraciones en los productos finales de mazapán (*Z. rouxii* y *D. hansenii*). Entre ellas, *T. delbrueckii* es una especie osmotolerante (Jermini *et al.*, 1987; Tokuoka e Ishitani, 1991); *I. orientalis* es capaz de deteriorar alimentos con elevado contenido de azúcar o de sal (Tilbury, 1976); y resiste hasta 0,8 g/L de ácido sórbico (Deak *et al.*, 1992); *C. glabrata* también puede alterar alimentos altamente azucarados (Tilbury, 1976). Para el aislamiento de levaduras a partir de estas almendras, como se cita en la Tabla 9, también se empleó el medio de enriquecimiento con 330 g/L de glucosa (YMBG) para favorecer la selección de organismos osmotolerantes, ya que sólo éstos serán potencialmente capaces de desarrollarse en los productos finales y dar lugar a su alteración.

Las cuatro muestras de azúcar refinado analizadas (muestras M24 a M27 de la Tabla 5 de Material y métodos) estaban libres de levaduras. Autores como Blaschke- Hellmesen y Teuschel (1970) tampoco encuentran levaduras osmotolerantes en el azúcar, aunque sí en otras materias primas; por el contrario, Pouncy y Summers, en 1939, afirmaron que las levaduras osmotolerantes son introducidas continuamente en las industrias con cualquier forma de azúcar que se recibe (Tudor y Board, 1993). Parece que los insectos (abejas, avispas y moscas de la fruta) juegan un importante papel en la transmisión de levaduras osmotolerantes entre frutas, miel o pilas de azúcar sin refinar; incluso se han aislado cepas de *Candida apicola*, *D. hansenii* y *Z. rouxii* del contenido abdominal de abejas y avispas (Tilbury, 1976). La esterilización de los jarabes de sacarosa y el refinado del azúcar son por tanto imprescindibles para su conservación. Así, el deterioro del azúcar refinado cristalizado es muy poco frecuente (Tilbury, 1976; Tudor y Board, 1993), sólo se conoce un caso en un silo de azúcar blanco donde había tenido lugar una migración de humedad, y la levadura responsable fue identificada como *C. apicola* (Tilbury, 1976). Por su parte, *Z. rouxii* sólo es capaz de contaminar soluciones de sacarosa de baja pureza y azúcar sin refinar (Tilbury, 1976; Tudor y Board, 1993).

El tratamiento térmico equivalente a una pasterización que se aplica a la pasta cruda de mazapán, tal y como se describió en el Apartado III.1 de Material y métodos, parece ser efectivo en la eliminación de las levaduras presentes, ya que no se recuperó ninguna cepa

tras el período de enriquecimiento de las muestras de masa de mazapán antes y después del período de reposo (M20 y M21, respectivamente). El horneado al que se someten los productos, que se denomina "hornaya", es un tratamiento térmico corto que puede ser inefectivo debido a la protección de los microorganismos frente al calor por la presencia de solutos como el azúcar (Golden y Beuchat, 1992b; Deak y Beuchat, 1996).

Las cepas de *Z. rouxii* identificadas en este trabajo no son capaces de asimilar la sacarosa. En general, mientras que *Z. rouxii* puede metabolizar con facilidad la glucosa, no es capaz de degradar la sacarosa o lo hace muy lentamente (Restaino *et al.*, 1983), por eso no es capaz de alterar azúcar refinado puro cristalizado o en solución. En estas condiciones predominan las levaduras productoras de **invertasa**, enzima que cataliza la escisión de la sacarosa -disacárido- en sus dos monosacáridos, glucosa y fructosa, cuya mezcla equimolecular es lo que se denomina **azúcar invertido** (Ranken, 1993).

Las cepas de levaduras con menores niveles de invertasa presentan una ventaja en sustratos con una elevada concentración de sacarosa respecto a las cepas con niveles altos de invertasa. La hidrólisis de la sacarosa, que libera glucosa y fructosa, incrementa la presión osmótica; por tanto, cuando las levaduras poseen una elevada actividad invertasa, se exponen más rápidamente a un mayor estrés osmótico, lo que puede conducir a la inhibición de las células (Myers *et al.*, 1997).

Puesto que en las pruebas de identificación *Z. rouxii* no fue capaz de fermentar ni asimilar en condiciones aerobias la sacarosa, cabe preguntarse cómo esta levadura es capaz de alterar productos fabricados a base de sacarosa. La explicación estriba en la proporción de azúcar invertido con la que suele sustituirse parte de la sacarosa, como se refirió en el Apartado III.1 de Material y métodos al describir la composición del mazapán; la utilidad del empleo del azúcar invertido reside en que, mientras que la sacarosa cristaliza con facilidad, de la mezcla equimolecular de glucosa y fructosa es muy difícil que se produzca la cristalización de la segunda, por lo que el azúcar invertido se emplea como humectante (Ranken, 1993). En lugar de azúcar invertido, también puede emplearse hidrolizado de almidón, con una composición en distintos azúcares reductores que pueden ser asimilados por *Z. rouxii*, detallada en el Apartado III.1 de Material y métodos.

Otras muestras de materias primas que aparecen en la Tabla 5 de Material y métodos y que no contienen levaduras son: yema confitada (M18) y boniato confitado (M19). Tampoco se detectaron levaduras en la masa de mazapán, tanto recién sometida a tratamiento térmico (M20) como tras 48 horas de reposo (M21). Por otra parte, aunque la presencia de levaduras en el ambiente es significativa -se puede aislar por ejemplo *D. hansenii* del aire (Deak y Beuchat, 1996)-, la contaminación por levaduras osmotolerantes no se produce normalmente a través del aire (Tilbury, 1976; Seiler, 1977). La contaminación final de los productos, como muchos autores (Blaschke-Hellmessen y Teuschel, 1970; Tilbury, 1976; Seiler, 1977; Jermini *et al.*, 1987; Tudor y Board, 1993) señalan, se debe probablemente al contacto físico con **reservorios** de levaduras, es decir, residuos previamente contaminados que permanecen en zonas poco accesibles a la limpieza a lo largo del equipo empleado en la manufactura, en superficies de trabajo, o localizaciones de almacenamiento. En estos reservorios, levaduras como *Z. rouxii* permanecen en estado latente en su fase estacionaria, y son transportadas y enriquecidas a lo largo de sucesivos lotes de fabricación.

En relación con las levaduras aisladas de otros productos altamente azucarados, consignadas en la Tabla 10, las especies identificadas son *P. guilliermondii* y *S. octosporus*, aisladas respectivamente de mermelada (M37) y miel de la utilizada como materia prima para turrón (M38). Mientras que la muestra de mermelada presentaba la alteración típica por desarrollo de levaduras -aroma alcohólico, gas en el recipiente y pérdida de masa sólida-, como se describió en el Apartado I.2 de la Introducción, la muestra de miel no presentaba ninguna alteración visible. Cabe suponer que la diferencia entre la simple presencia de levaduras en la segunda muestra y la alteración de la primera se debe al número de células presente, ya que en la mermelada se recuperaron levaduras en el primer aislamiento (3 días), y en la miel fueron necesarios 10 días de incubación en el medio de enriquecimiento -YMBG- para detectar la presencia de levaduras.

Durante la transformación del néctar en miel, las abejas reducen el contenido en agua del primero de 30-60 a 15-19% (p/p) y producen una apreciable conversión de la sacarosa a través de la adición de invertasa (Tudor y Board, 1993). La miel es además un sustrato del que se conoce que posee actividad antimicrobiana, debido a la presencia de

ciertas sustancias procedentes de las abejas denominadas **inhibinas**, entre las cuales cabe destacar el peróxido de hidrógeno, así como flavonoides, y ácidos fenólicos: ácido cafeico y ferúlico (Wahdan, 1998). La glucosa oxidasa, que produce peróxido de hidrógeno y causa una ligera acidificación, es probablemente el principal agente antimicrobiano de la miel (Tudor y Board, 1993).

P. guilliermondii es una especie de levadura que se aísla de ambientes diversos, como insectos, suelo, aire, flores, hombre, zumos de fruta, cerveza, etc. (Barnett *et al.*, 1990), por lo que la contaminación de productos, en este caso mermelada, expuestos al ambiente y al contacto humano, no es extraña. Es capaz de crecer en un 57% (p/p) de glucosa, equivalente a un valor de a_w de 0,865, por lo que normalmente produce deterioro de productos altamente azucarados (Tilbury, 1976).

S. octosporus es una especie de levadura que sólo se ha aislado de miel, como en este trabajo, y de grosellas (Barnett *et al.*, 1990). Una característica importante es que se trata de una levadura de fisión, es decir, que su reproducción vegetativa es por partición y no por gemación, que es la forma más corriente en levaduras (Davenport, 1981).

Anteriormente esta especie se consideraba la única representante del género *Octosporomyces* (Barnett *et al.*, 1990), denominándose por tanto *O. octosporus*, en alusión a la producción característica de hasta 8 ascosporas por célula, como se describirá en el Apartado V.2. Actualmente este género no existe, y su única especie se ha incluido en el género *Schizosaccharomyces*, cuyas especies se comportan como las levaduras fermentativas clásicas, como *Saccharomyces*, pero difieren por su peculiar modo de reproducción vegetativa. Son osmotolerantes, y *S. octosporus* en particular es conocida por su capacidad de alterar jarabes y concentrados de frutas (Deak y Beuchat, 1996).

De las muestras M39 (miel), M40 (bolitas de coco), M41 (yemas) y M42 (cereales con pasas), no se pudieron estudiar los agentes causantes de las alteraciones enumeradas en la Tabla 6 de Material y métodos. En la miel y las yemas, es posible que el tiempo transcurrido entre la aparición de la alteración y el de la obtención de la muestra y su análisis haya sido suficientemente largo como para no recuperar ningún microorganismo,

ni siquiera tras un largo período de enriquecimiento en YMBG. De las bolitas de coco tampoco se recuperó ningún microorganismo, y de los cereales con pasas se recuperaron, en YMBG, bacilos como los descritos antes de este apartado, cuyo estudio queda fuera de los objetivos de este trabajo.

Por último, y tras discutir el aislamiento de levaduras a partir de las distintas muestras analizadas, es posible hacer ciertas consideraciones acerca de la duración del período de enriquecimiento. Según los resultados obtenidos, parece evidente que sólo los primeros 15 días de incubación son necesarios para la caracterización de las levaduras presentes en las muestras. Por una parte, en muestras como M1, M7, M23 o M38, el tiempo necesario para conseguir el aislamiento de las primeras cepas -1E, 10E, 28E2, 39E2, respectivamente- fue de 10-14 días. Por otra parte, en muestras como M29, el aislamiento de una segunda especie de levadura -*L. elongisporus*, 30E2(1) y (2)- tuvo lugar también a los 10 días, mientras que en el primer aislamiento la cepa aislada pertenecía a otra especie -*S. cerevisiae*, 30E1-. Tras dos semanas de incubación, no se consiguió aislar ninguna especie nueva de ninguna de las muestras, incluso en algunas de ellas -M22, M28- las levaduras presentes en aislamientos previos no se recuperaron tras un mes de incubación. Este efecto es debido al prolongado período de incubación de las muestras, con la consiguiente acumulación de metabolitos en el medio de cultivo, y a la elevada concentración de azúcar del mismo, ya que, como se mencionó en el Apartado I.2 de la Introducción, estas levaduras son osmotolerantes y no osmófilas, por lo que crecen mejor en presencia de concentraciones más bajas de azúcar. Estos factores también pueden explicar en parte la incapacidad de algunas cepas correspondientes a los últimos aislamientos para reproducir el olor a "petróleo" (20E4) y sobre todo la producción de gas (14E4, 22E4, 24E4 y 26E3), como se discutirá en el apartado correspondiente.

V.1.2.- Hongos filamentosos

Respecto a los hongos filamentosos o mohos (Tabla 11), lo más destacado es el reducido número de aislamientos respecto al de levaduras. De los productos de mazapán que se enumeran en la Tabla 4 de Material y métodos, sólo la muestra M17, correspondiente a un pan de Cádiz, presentaba crecimiento fúngico visible en la superficie

(H1). Otro pan de Cádiz (M11), que contenía mohos (H1 y H2), no presentaba crecimiento fúngico evidente. Esto mismo sucede en la muestra M35 de turrón de frutas (Tabla 4 de Material y métodos), de composición similar al pan de Cádiz, de la que se aisló el hongo H5, que no se desarrolló visiblemente.

En los alimentos de humedad intermedia, sustratos que permiten el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos osmotolerantes, parece existir una marcada **competencia** entre ambos tipos de organismos. A ello se debe que un moho se desarrolle visiblemente sólo cuando las levaduras están ausentes, ya que en caso contrario, son las levaduras las que colonizan el alimento y producen su deterioro, y la presencia de mohos pasa inadvertida. Puesto que tanto estas levaduras como los mohos son resistentes al sorbato, desarrollándose en presencia del mismo en el sustrato, la ventaja fisiológica de las primeras sobre los segundos es su mayor actividad metabólica (el crecimiento de los mohos es mucho más lento), su capacidad de crecer en ausencia de oxígeno (estos productos suelen comercializarse envasados individualmente bajo atmósfera modificada) y su capacidad para producir y tolerar alcohol, CO₂ y ácidos orgánicos (Fleet, 1992), creando ambientes desfavorables para el crecimiento fúngico (Tilbury, 1976; Restaino *et al.*, 1983).

En productos como las marquesas (M34 y M36), invariablemente se aíslan hongos filamentosos (H3 y H6, respectivamente) que, aún sin desarrollar micelio visible, dan lugar a la aparición de olores y sabores extraños. El que en este tipo de alimento se aíslen hongos filamentosos y no levaduras parece deberse a la menor concentración de azúcar de su composición, al mezclar la pasta de mazapán con huevos y almidón, como se describió en el Apartado III.1 de Material y métodos. También la textura esponjosa, más rígida que los productos anteriores, puede tener cierta influencia en el predominio de los hongos filamentosos, ya que éstos tienen mayor capacidad de colonizar y penetrar sustratos sólidos (Tilbury, 1976).

Los hongos H1 a H6 fueron identificados dentro del género *Penicillium*. Este género de hongos es bien conocido por su capacidad de degradar el sorbato, como se describió en la Introducción (Apartado I.3.2). Este hecho, junto con su capacidad de crecer a valores relativamente bajos de a_w , entre 0,79 y 0,83 (ICMSF, 1991), hace que estos organismos

sean peligrosos por poder desarrollarse en productos azucarados y en presencia de sorbato, como las muestras de las que se han aislado las cepas de este trabajo.

Las cepas H1, H3, H4 y H5 fueron identificadas dentro de la especie *P. chrysogenum*. Tanto la morfología de las colonias como la estructura microscópica son comunes a las cuatro cepas, pero cabe hacer una distinción entre ellas. H1 y H3 son idénticas en cuanto a la producción del pigmento amarillo característico de esta especie, y la ausencia de crecimiento a 37°C. Por el contrario, H4 y H5 carecen de pigmento amarillo y ambas crecieron a 37°C, dando lugar a colonias de 8 mm de diámetro. Pitt (1991) describe un crecimiento variable a 37°C dentro de *P. chrysogenum*, desde especies incapaces de crecer a esta temperatura hasta otras que producen colonias de 5 mm de diámetro. Asimismo, este autor refiere, dentro de esta especie, aislamientos que carecen de pigmentación amarilla; de hecho, estos *P. chrysogenum* no pigmentados se agrupaban, antes de 1979, en una especie separada -*P. meleagrinum*-, que posteriormente se incluyó dentro de *P. chrysogenum* junto con la conocida especie *P. notatum*, cuya cepa tipo es, precisamente, un *P. chrysogenum*. Actualmente, *P. notatum* y *P. meleagrinum* se consideran sinónimos de *P. chrysogenum* (Pitt, 1991).

P. chrysogenum es un hongo ubicuo, que se encuentra entre las formas eucarióticas de vida más comunes en el mundo. Ocupa un rango muy amplio de habitats en suelos, vegetación en descomposición y alimentos. Su distribución parece ser universal, a lo largo de todas las regiones y climas biológicamente accesibles (Pitt, 1991). Las cepas xerotolerantes son capaces de crecer en sustratos con una a_w de 0,80, aproximadamente (El Halouat y Debevere, 1997).

Por su parte, H2 pertenece a la especie *P. crustosum*. Además del tamaño y textura de las colonias, diferente de las demás especies de *Penicillium* identificadas en este trabajo, la cepa de *P. crustosum* produjo un exudado marrón, y en la placa de MEA, tras la manipulación necesaria para la identificación, el medio que rodeaba las colonias crecidas en los puntos de inoculación se recubrió de colonias secundarias, como se aprecia en la Fotografía 7 (a y b). Esta característica distintiva de *P. crustosum*, debido a la fácil dispersión de los conidios en este medio, sirvió para confirmar la identificación.

Aunque *P. crustosum* se aísla principalmente de frutas pomáceas, Pitt (1991) lo considera un hongo ubicuo responsable de alteraciones, mencionado con muy poca frecuencia en la literatura debido a la confusión en su taxonomía con otras especies del subgénero *Penicillium*. Bajo distintos nombres, *P. crustosum* ha sido responsable del deterioro de maíz, carnes procesadas, queso, galletas, zumos de frutas, etc. (Kinderlerer y Hatton, 1990; Pitt, 1991).

Tanto *P. chrysogenum* como *P. crustosum* pertenecen al subgénero *Penicillium*, que se caracteriza fundamentalmente por poseer penicilios terverticilados. Dentro de este subgénero, el sector *Penicillium*, al que pertenecen ambas especies, se diferencia de los demás sectores por la forma y color de los conidios -esféricos o elipsoidales, y verdes o azules- y la estructura del penicilio -regular y con un máximo de dos ramas-.

Las especies del subgénero *Penicillium* presentan además afinidades entre sí. De esta manera, la principal afinidad de *P. chrysogenum* corresponde a las demás especies del sector *Penicillium*, aunque también muestra afinidad con especies del subgénero *Furcatum*, como puede ser *P. citrinum*; su capacidad de crecer lentamente a 37°C apoya esta observación. Por su parte, *P. crustosum* ha sido usualmente confundido con *P. viridicatum* y *P. aurantiogriseum*, con los cuales presenta afinidades, así como con *P. roquefortii* y *P. expansum*, perteneciendo todas estas especies al sector *Penicillium* (Pitt, 1991).

El hongo H6 ha sido identificado como *P. simplicissimum*. A diferencia de las anteriores, esta especie pertenece al subgénero *Furcatum*, que se caracteriza por poseer penicilios biverticilados y de médula mucho más larga que las fiálides. *P. simplicissimum* se encuentra entre las especies de *Penicillium* más frecuentemente aisladas; es un activo agente degradativo y ha sido aislado de muchos tipos de materiales en descomposición, así como de suelos. Al igual que en el subgénero *Penicillium*, *P. simplicissimum* presenta, dentro del subgénero *Furcatum*, afinidades con *P. oxalicum* respecto a la tasa de crecimiento a 25°C y el tipo de conidióforo. Ambas especies pertenecen al sector *Furcatum*, puesto que poseen penicilios regulares que parten de verticilos terminales de médulas (Pitt, 1991).

La muestra de miel que aparecía turbia (M39) contenía un hongo, H7, identificado como *Aspergillus niger*. Dentro de este género se encuentran especies osmofílicas, capaces de alterar alimentos con un valor de a_w entre 0,75 y 0,90, como los productos de panadería (Viñas *et al.*, 1990), o frutas secas hidratadas (El Halouat y Debevere, 1997). El ICMSF (1991) establece, para especies de *Aspergillus*, una a_w mínima para el crecimiento de 0,75-0,82. Según Tilbury (1976) y Tudor y Board (1993), la a_w de la miel se encuentra en el rango de 0,75-0,80, valor que permite el desarrollo miceliar de esta especie.

A. niger var. *niger* es una especie ubicua, que se encuentra normalmente en suelos, plantas, semillas, frutas desecadas y frutos secos. Es uno de los hongos aislados con mayor frecuencia en alimentos (Klich y Pitt, 1988).

V.2.- Esporulación

Para el estudio de la esporulación, se escogieron los primeros aislamientos de todas las muestras que contenían levaduras: 1E (M1), 2E (M9), 3E y 4E (M6), 10E (M7), 14D (M11), 24E1 (M12), 26E1 (M16), 27E1(1) y 27E1(2) (M22), 29E1 (M28), 30E1 (M29), 32E1 (M30), 33E1(1) y 33E1(2) (M31), 34E1(1) y 34E1(2) (M32), 35E1(1) y 35E1(2) (M33), 36E1 (M35), 38E1 (M37) Y 39E2 (M38). Los resultados que se discuten a continuación corresponden a las Tablas 12a y 12b del Apartado III.4.1 de Resultados.

De estas levaduras escogidas como representantes, la especie más frecuentemente identificada es *Z. rouxii*, con 11 aislamientos de 22. Entre ellas, sólo dos (cepas 2E y 14D) no esporularon. Las tres cepas de *D. hansenii* (cepas 3E, 4E y 10E) fueron esporógenas, así como las únicas cepas representantes de *T. delbrueckii* (cepa 27E1(2)), *S. cerevisiae* (cepa 29E1) y *S. octosporus* (cepa 39E2). Por el contrario, además de *C. glabrata* (cepa 28E2), de la que no existe estado perfecto, tampoco esporularon las cepas de *I. orientalis* (cepa 27E2(1)), *L. elongisporus* (cepas 30E1, 33E1(1) y 33E1(2)) y *P. guilliermondii* (cepa 38E2).

Yarrow (1984) clasificó los géneros *Zygosaccharomyces* y *Torulaspota* fuera del género *Saccharomyces*, incluyendo dentro de este último las especies en las que la fase

vegetativa es predominantemente diploide, mientras que aquellas en las que la fase vegetativa es predominantemente haploide se clasifican como *Zygosaccharomyces* y *Torulaspota*. El hecho de que la fase vegetativa predominante en *Z. rouxii* sea haploide explicaría en parte la presencia de algunas cepas no esporógenas, que indicaría la ausencia de *mating-types* (cepas sexualmente compatibles) necesarios para la conjugación de los organismos haploides (Jermini *et al.*, 1987; Deak y Beuchat, 1996). De hecho, varios autores (Tilbury, 1976; Barnett *et al.*, 1990; Taing ok y Hashinaga, 1997) refieren que la identificación de ciertas levaduras osmotolerantes, como *Z. rouxii* o *Z. bisporus*, es complicada por la facilidad con la que pueden perder su capacidad de esporular. Al ser especies heterotálicas (ver Apartado I.4 de la Introducción), normalmente se encuentran en estado haploide, de manera que el aislamiento de una cepa a partir de una única colonia puede conducir a la selección de un único *mating-type*, que será incapaz de esporular en ausencia de su *mating-type* complementario (Deak y Beuchat, 1996). Otra explicación para la ausencia de esporulación en estas cepas concretas es que las condiciones o los medios de cultivo elegidos no sean favorables para la conversión en el estado perfecto en estos medios (van der Walt y Yarrow, 1984; Davenport, 1981). Muchas levaduras, tras ser subcultivadas repetidamente, pierden su capacidad de esporular, aunque en ocasiones se habían podido observar sus esporas en aislamientos recientes y a veces en los propios productos alterados, antes del aislamiento de las cepas (Davenport, 1981; Barnett *et al.*, 1990; Deak y Beuchat, 1996; Yarrow, 1998). También se han señalado la dificultad de observación, incluso la falta de experiencia del investigador, como causas de no poder detectar el estado perfecto (Barnett *et al.*, 1990).

Como ya se ha expuesto en el Apartado V.1.1, las cepas de *L. elongisporus* mostraron, al ser identificadas según la metodología descrita por Barnett *et al.* (1990), propiedades bioquímicas y fisiológicas coincidentes con el perfil de *D. hansenii*. Esta semejanza no es la única: el análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 18s (Cai *et al.*, 1996) reveló que el grupo filogenético en el que se incluyen las especies del género *Debaryomyces* presentaba una asociación significativa con el *cluster* en el que se integra *L. elongisporus*. Sin embargo, la identificación final de las cepas 30E1, 33E1(1) y 33E1(2) fue como *L. elongisporus*, entre otras razones que ya se han explicado, precisamente por la ausencia de ascosporas. *D. hansenii* es una levadura que esporula con

facilidad, y por tanto las especies 30E1, 33E1(1) y 33E1(2), que no esporularon en ninguno de los medios ensayados, no pudieron ser identificadas como pertenecientes a esta especie. Este hecho evidencia la importancia de la observación de esporas para la caracterización taxonómica de las levaduras, aún cuando el sistema de identificación empleado no sea una clave dicotómica.

Respecto a la incidencia de la esporulación en los diferentes medios, el primer aspecto a mencionar es que, aunque Codón *et al.* (1995) refirió que la esporulación se favorecía en medio líquido en relación con el correspondiente medio sólido, los resultados obtenidos con las cepas de este trabajo no lo confirman. La observación de esporas en medio líquido se abandonó principalmente por tres razones: 1) el menor número de células recogido con el asa de siembra o la pipeta para su observación sobre el portaobjetos; 2) la dificultad de observación de células aisladas debido a la formación de agregados o pseudomicelio; y 3) la aparentemente menor frecuencia de esporulación. Según Tilbury (1976), las levaduras osmotolerantes crecen mejor sobre la superficie de los medios sólidos que en los medios líquidos.

El número del total de cepas esporógenas representantes estudiadas que esporularon en cada medio sólido es, en orden decreciente: V8/10: 15 cepas; 2% NaCl, PDA, GOR, EMB: 12 cepas; YEGP: 11 cepas; ME, V8: 10 cepas; YMA: 9 cepas; CMA: 7 cepas; AA-3: 6 cepas; AA-2: 5 cepas; SPO-1: 4 cepas; MAc: 3 cepas; AA-1: 1 cepa.

En general, los medios más adecuados para inducir la esporulación fueron aquéllos pobres en nutrientes, como V8/10, PDA, GOR, ME, V8 y CMA, o con algún factor estresante como 2% NaCl (con una concentración moderadamente elevada de sal) o EMB (que contiene los colorantes eosina y azul de metileno). Un segundo grupo comprende medios ricos en nutrientes como YEGP o YMA, en los cuales las levaduras, al poder crecer profusamente, agotan todos los nutrientes disponibles y pueden iniciar la esporulación durante el posterior período de latencia (Freese *et al.*, 1982). Según Suizu *et al.* (1995), en un medio rico con una concentración inicial de un 1% de glucosa, el azúcar es consumido a los dos días de incubación. Estos mismos autores afirman que la transducción de la señal nutricional necesaria para la meiosis y/o esporulación en condiciones de abundancia de nutrientes es diferente de la que tiene lugar en condiciones de escasez de nutrientes.

Otros medios, como AA-1, AA-2, AA-3, SPO-1 y SPO-2, contienen acetato, un inductor de la esporulación bien conocido (Freese *et al.*, 1982; Códón *et al.*, 1995; Suizu *et al.*, 1995). *S. cerevisiae* puede utilizar para su crecimiento fuentes de carbono tanto glucolíticas -glucosa, fructosa- como gluconeogénicas -acetato, etanol, piruvato- (Freese *et al.*, 1982). Para optimizar la esporulación, las células deben crecer bajo condiciones en las que todas las enzimas del ciclo del glioxilato y enzimas gluconeogénicas están desreprimidas, por ejemplo en agar con acetato (Miller, 1989; Códón *et al.*, 1995). El medio MAc contiene ácido acético, que al ser una molécula neutra puede traspasar la membrana celular mucho más rápidamente que su correspondiente anión acetato (Freese *et al.*, 1982). Sin embargo, en medios como MAc, SPO-1 o AA-1, el crecimiento de las levaduras fue tan escaso que su utilidad, al menos para este trabajo, fue muy limitada. La transferencia desde un medio con exceso de fuente de carbono a otro con fuente de carbono limitada permite sólo un metabolismo celular lento (Freese *et al.*, 1982).

Los medios más recomendables para la esporulación serían aquéllos en los cuales han esporulado mayor número de cepas. Sin embargo, el orden anterior varía según la especie:

- *Z. rouxii* (9 cepas esporógenas de 11): V8/10, EM: 9 cepas; GOR, EMB: 7 cepas; PDA: 6 cepas; 2% NaCl, YEGP: 5 cepas; YMA, V8: 4 cepas; AA-2, AA-3, CMA: 2 cepas; MAc, SPO-2: 1 cepa; AA-1, SPO-1: ninguna cepa esporulada.
- *D. hansenii* (3 cepas): YMA, 2% NaCl, YEGP, PDA, V8, V8/10; EMB, CMA: 3 cepas; GOR, AA-2, AA-3, SPO-1, SPO-2: 2 cepas; EM, MAc, AA-1: ninguna cepa esporulada.
- *T. delbrueckii* (1 cepa): esporuló en YMA, YEGP, PDA, GOR, V8, V8/10, EMB, MAc, AA-2, AA-3, CMA, SPO-1 y SPO-2.
- *S. cerevisiae* (1 cepa): esporuló en YMA, 2% NaCl, YEGP, EM, PDA, GOR, V8, V8/10, EMB, MAc, AA-2, AA-3, CMA, SPO-1 y SPO-2.
- *S. octosporus* (1 cepa): esporuló en YMA, 2% NaCl, YEGP, EM, PDA, GOR, V8, V8/10 y AA-1.

Se puede observar que medios en principio recomendables como EM, en el cual esporularon 10 cepas de 15 esporógenas, parece ser inadecuado para la esporulación en *D. hansenii*, ya que ninguna de las tres cepas estudiadas lo hicieron en este medio. Por el

contrario, las tres cepas de *D. hansenii* esporularon en medios como V8 o CMA, mientras que menos de la mitad de las cepas de *Z. rouxii* -4 y 2 cepas, respectivamente- lo hicieron en estos mismos medios. Además, el comportamiento de las cepas de *Z. rouxii* no concuerda con el observado por Jermini *et al.* (1987) en otras siete cepas esporógenas de esta misma especie, de las cuales todas esporularon en CMA, una en EM, una en AA-3 y ninguna en V8, aunque sí con los resultados obtenidos por Taing ok y Hashinaga (1997), que observaron esporas de cepas osmotolerantes de *Z. rouxii* en EM y V8. Respecto a otras especies, no cabe hacer comparaciones, al haberse estudiado sólo una cepa de cada una. Aparentemente, V8/10 es el medio común recomendable, pues todas las cepas esporógenas representadas esporularon en él, aunque, como señalan Freese *et al.* (1982) y Barnett *et al.* (1990), es adecuado emplear simultáneamente más de un medio de esporulación.

Además de la composición de los medios de pre- y esporulación, hay otros factores extrínsecos pero también intrínsecos que afectan a la incidencia de la esporulación. Especies como *D. hansenii*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* o *S. octosporus* esporularon en la mayoría de los medios ensayados, al menos las cepas estudiadas aquí. Por ejemplo, *S. cerevisiae* incluso esporuló en 2% NaCl, EMB y MAc, que son medios descritos para la esporulación en *Z. rouxii* (Davenport, 1980). Asimismo, las cepas de *D. hansenii* esporularon en 2% NaCl y EMB, *T. delbrueckii* en EMB y MAc, y *S. octosporus* en 2% NaCl. Por el contrario, algunas cepas esporógenas de *Z. rouxii* no esporularon en estos medios recomendados, como las cepas 35E1(1) y 35E1(2) en 2% NaCl, las cepas 32E1 y 35E1(2) en EMB y las cepas 24E1, 26E1, 32E1, 35E1(2) y 36E1 en MAc, donde incluso el crecimiento fue escaso o nulo.

No se puede concluir nada más acerca de la esporulación en las especies que sólo tienen un representante. Entre las cepas de *Z. rouxii*, algunas de ellas esporularon con facilidad, como las cepas 24E1, 34E1(2) ó 35E1(1), mientras que las cepas 32E1, 34E1(1) y 35E1(2) esporularon con dificultad. Las diferencias entre las cepas de *Z. rouxii* que esporularon con facilidad y las que lo hicieron con dificultad no se refieren sólo al número de medios en los que esporularon, sino también a otros aspectos que no reflejan las tablas, como el número de células esporuladas en esos medios (mucho mayor en las primeras) y/o el tiempo necesario para la observación de las mismas (más corto para las primeras).

El crecimiento en medios con acetato fue muy limitado. Se puede deducir que este sustrato no puede ser asimilado como fuente de carbono por las cepas estudiadas, o bien éstas no se han adaptado al paso de un metabolismo glucolítico a otro gluconeogénico utilizando como sustrato al acetato. También puede influir la ecología (Jermini *et al.*, 1987) de estas levaduras: las levaduras osmotolerantes aisladas de alimentos altamente azucarados pueden ser incapaces de adaptarse a medios con muy poca glucosa (AA-2, AA-3, SPO-1), o incluso con ausencia de azúcar (AA-1, SPO-2).

Se conocen otros factores, como la temperatura de incubación, pH de los medios, fase de crecimiento durante la que los cultivos de levadura son transferidos desde el medio de presporulación al medio de esporulación y número de células transferidas, que también influyen en la esporulación.

Los estudios de Suizu *et al.* (1995) con *S. cerevisiae* determinaron que el crecimiento era máximo a pH 6,0 y se detenía completamente a pH 8,0; la formación de ascosporas era máxima a pH 7,0 y disminuía de acuerdo con el descenso en el pH original del medio rico en nutrientes. Asimismo, cuando la esporulación tenía lugar en un medio pobre que contenía acetato potásico, el pH del medio se incrementaba de 7 a 9; como las células de levadura no crecen a pH por encima de 8, se desconoce si la supresión del crecimiento (detención de la mitosis en la fase G1) se debe a la deficiencia en nutrientes o al elevado pH.

La competencia para la esporulación también depende del desarrollo de la capacidad oxidativa; las células crecidas en acetato o glicerol, ninguno de los cuales requiere que las células pasen por un período de adaptación respiratoria al transferirlas al medio de esporulación, esporulan mejor cuando son recogidas durante la fase logarítmica de crecimiento, mientras que las células crecidas en glucosa lo hacen cuando se toman de cultivos en fase estacionaria temprana (Codón *et al.*, 1995).

La esporulación en medios con nutrientes limitados depende asimismo de la concentración de células transferidas desde el medio rico de presporulación, debiendo ser de al menos 10^5 UFC/mL (Suizu *et al.*, 1995).

Para optimizar la esporulación, se han adoptado sólo las condiciones más favorables; temperatura subóptima de incubación (ver Material y métodos), pH recomendado para cada medio (ver Material y métodos) y transferencia de los cultivos en fase estacionaria temprana. La frecuencia de observación de esporas es mayor que la generalmente descrita (Tilbury, 1976; Jermini *et al.*, 1987), por lo que la combinación de varios factores parece favorecer efectivamente la esporulación.

Respecto a las condiciones más adecuadas para la observación de ascosporas, cabe destacar que la utilización de 400 aumentos, empleada para la observación de organismos eucariotas, no permitió distinguir esporas tan claramente como con 1000, y la presencia de éstas podría pasar inadvertida. En especies como *D. hansenii*, las esporas se pueden detectar con facilidad, por su alta frecuencia de esporulación y la morfología característica: una única ascospora, de pared gruesa, dentro de una célula madre normalmente conjugada con su yema. Asimismo, la única cepa representante de *S. cerevisiae* formó abundantes tetradas. Sin embargo, las paredes de las ascosporas de *Z. rouxii* son más finas y sólo pudieron distinguirse claramente utilizando 1000 aumentos, observándose dos células conjugadas y en el interior de una de ellas las esporas, generalmente dos (diadas) y en algunas cuatro; estas observaciones coinciden con las que refieren Taing ok y Hashinaga (1997) para las cepas osmotolerantes de *Z. rouxii* que estudiaron. La cepa representante de *T. delbrueckii* formó usualmente una ascospora por célula, pudiéndose observar además tubos de conjugación característicos; la cepa osmotolerante de esta especie aislada por Taing ok y Hashinaga (1997) formaba dos ascosporas por célula. En *S. octosporus*, lo más llamativo fue el número de esporas, hasta ocho en una misma célula.

Estas condiciones de observación microscópica no hicieron necesaria la aplicación de la tinción diferencial de ascosporas por la técnica del verde de malaquita y safranina de Schaeffer y Fulton para esporas bacterianas (van der Walt y Yarrow, 1984; Davenport, 1981) como confirmación.

En todas las cepas esporógenas, excepto 32E1 (*Z. rouxii*) y 39E2 (*S. octosporus*), fueron necesarios sólo siete días de incubación en V8/10 para la observación de esporas, mientras que en otros medios como 2% NaCl, EMB, PDA o GOR el período de incubación

requerido fue más largo, de hasta seis semanas. En general, las cepas de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *D. hansenii* esporularon más rápidamente que *Z. rouxii* o *S. octosporus*.

V.3.- Reproducción de las alteraciones

V.3.1.- Reproducción del olor a "petróleo" y/o gas

En un estudio previo (Casas *et al.*, 1996) se aislaron varias cepas de levadura a partir de muestras de productos a base de mazapán que presentaban el mismo tipo de alteración estudiado en este trabajo, es decir, aparición de un olor característico a "petróleo" acompañado o no del hinchamiento de los envases. Con objeto de comprobar que tales levaduras eran las responsables de la alteración, las cepas se sembraron en porciones del mismo sustrato así como en diferentes medios de laboratorio que intentaban reproducir las condiciones del producto. Las cepas aisladas reprodujeron el olor a "petróleo" preferentemente en uno de los medios experimentales empleados, de hecho algunas cepas lo hicieron en el medio experimental pero no en el propio sustrato. Dicho medio contenía 600 g/L de sacarosa y sorbato en la misma proporción que el mazapán (0,5 g/L de ácido sórbico y 0,75 g/L de sorbato potásico), y cuyo pH era de 7,1. Así, en ensayos posteriores se optó por la utilización del medio experimental, puesto que facilita la reproducción del efecto y es más fácil prepararlo que disponer de muestras de mazapán que no contengan levaduras.

Posteriormente, se modificó la adición del conservante, para contener 1 g/L de sorbato (Casas *et al.*, 1999), y finalmente se adoptó una concentración de 0,5 g/L, y el pH resultante, 6,3, se mantuvo sin ajustar. Por una parte, la adición de la mitad de la dosis inicial de conservante facilita la degradación del mismo, y se continúa detectando con facilidad la aparición del olor característico, ya que este tipo de metabolitos volátiles, aún producidos en pequeña cantidad, tienen umbrales de olor y sabor muy bajos (Fleet, 1992).

Por otra parte, la adición del conservante en forma de sal potásica tiene dos ventajas fundamentales para la reproducción del efecto, que ya fueron descritas en el Apartado I.3 de la Introducción. Una de ellas es la mayor solubilidad de la sal en medio acuoso, ya que

el ácido sórbico es prácticamente insoluble. Otra ventaja es que su poder inhibitorio es mucho menor, y al mantener el pH en un valor cercano a la neutralidad (6,3), la presencia de la forma ácida es muy escasa. EL pK_a del ácido sórbico (referido a su constante de disociación) corresponde a un pH del medio de 4,76 (Sofos, 1989), valor al cual el 50% del compuesto está en forma protonada; a medida que el pH del medio asciende por encima de este valor, la concentración de la forma ácida disminuye, de manera que, para un producto con un pH de 5,8 y una concentración de sorbato del 0,2%, sólo un 0,014% del compuesto se encuentra en forma protonada (Sofos, 1989).

En la Tabla 13 aparecen los resultados de la reproducción del olor a "petróleo" y/o producción de gas por todas las cepas de levaduras aisladas de distintas muestras que presentaban esta característica alteración. Como puede observarse, la gran mayoría de estas cepas, pertenecientes a las especies *Z. rouxii* y *D. hansenii*, reprodujeron el olor a "petróleo" en las condiciones de experimentación que figuran a pie de tabla.

A pesar de que Tilbury (1976) y Praphailong y Fleet (1997) establecen que alimentos altamente azucarados sin conservantes son deteriorados por *Z. rouxii*, y aquéllos con a_w más alta pero que contienen conservantes por *Z. bailii*, esta última especie de levadura no fue identificada en ninguna de las muestras, y la resistencia al sorbato se manifestó en otras dos especies, *Z. rouxii* y, sorprendentemente, *D. hansenii*.

Es un hecho conocido que el ácido sórbico puede ser metabolizado por varios microorganismos, al menos en aerobiosis (Warth, 1977; Deak *et al.*, 1992), lo que se atribuye a un proceso de **destoxificación** (Sofos, 1989; Kinderlerer y Hatton, 1990). En mohos, algunas cepas pueden metabolizar el sorbato para dar CO_2 y H_2O como productos de la β -oxidación, 1,3-pentadieno y otra serie de compuestos orgánicos. La capacidad de descarboxilar el sorbato a 1,3-pentadieno parece estar restringida al género *Penicillium*, y es un compuesto volátil que posee un característico olor descrito como a "hidrocarburo", "pintura" o "keroseno", fácilmente detectable en algunos alimentos y bebidas tratados con sorbato (Marth *et al.*, 1966; Finol *et al.*, 1982; Liewen y Marth, 1985a y b; Sofos, 1989; Kinderlerer y Hatton, 1990; Sofos y Busta, 1993). Las bacterias lácticas también pueden transformar el sorbato en 1,3-pentadieno de manera similar a la de los hongos (Sofos, 1989;

Sofos y Busta, 1993). Por su parte, se han citado ciertas especies de levaduras (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. claussenii* y *C. utilis*) capaces de asimilar sorbato como única fuente de carbono (Deak y Novak, 1972).

En el estudio de Casas *et al.* (1996) mencionado anteriormente, las levaduras responsables de la producción del olor a "petróleo" fueron identificadas como *D. hansenii*. El presente trabajo, junto con dicho estudio, constituyen hasta el momento las dos primeras referencias de levaduras responsables de este tipo de alteración.

Como se observa en la Tabla 13, las cepas de *D. hansenii* no produjeron gas en este experimento ni en ninguno de los posteriores; por el contrario, salvo excepciones (14E4, 22E4, 24E4, 26E3 y 26E4), las cepas de *Z. rouxii* produjeron gran cantidad de gas en el medio. Este gas, presumiblemente CO₂ procedente de la fermentación de la glucosa, sería el responsable del hinchamiento de los envases individuales de los productos alterados.

Dentro de la especie *Z. rouxii*, algunas de las cepas aisladas (15D, 16D, 20E4, 21D, 22E2) no pudieron reproducir el olor a "petróleo". Si bien es posible que estas cepas sean resistentes al sorbato sin degradarlo, puesto que fueron capaces de crecer y fermentar el azúcar con producción de gas, es más probable que, por alguna razón, como puede ser el mantenimiento de las cepas en ausencia de sorbato -sería como un "desacondicionamiento"- no hayan degradado el sorbato, ya que otras cepas de la misma especie aisladas de las mismas muestras tras distintos tiempos de incubación (ver Tabla 8), que pueden ser las mismas, sí lo hicieron.

En la Tabla 13 también se recoge la reproducción de estos efectos por parte de levaduras aisladas de productos sin alterar, recogidos en la Tabla 4 de Material y métodos. Llama la atención el hecho de que ninguna de las cepas identificadas como *S. cerevisiae* o *L. elongisporus* reprodujeron ni olor ni gas, pero sí las cepas 32E1-32E4; estas cuatro levaduras se identificaron como *Z. rouxii* (Tabla 8), por lo que su capacidad de reproducir la alteración en medio experimental antes de que ésta sea evidente en el producto hace suponer que con el tiempo acabará teniendo lugar la alteración del mismo, como sucede en otras muestras de mazapán que contenían *Z. rouxii*. En la rapidez con que se reproduce

la alteración en medio líquido respecto del deterioro en las muestras se basa el método estandarizado que se describe más adelante para la detección de levaduras potencialmente peligrosas en el análisis rutinario industrial de los distintos lotes.

Por otra parte, también es interesante observar que especies de levaduras como *S. cerevisiae* (29E1-29E4), típicamente fermentativa, no produzca gas en un medio azucarado. Este resultado refleja que, aunque la levadura sea capaz de crecer en presencia de sorbato, lo que se aprecia por la aparición de turbidez en el medio, al menos la capacidad fermentativa de estas cepas es afectada por la presencia de conservante y/o la concentración de azúcar -60% de glucosa- del medio, ya que *S. cerevisiae* no es en principio resistente a los conservantes ni osmotolerante (Fleet, 1992), a pesar de haber sido aislada en un medio con 33% de glucosa, YMBG. La inhibición de la fermentación puede explicarse por algunos de los mecanismos de acción del sorbato descritos en el Apartado I.3.1 de la Introducción.

La Tabla 14 muestra la reproducción de olor y/o gas por las levaduras aisladas de materias primas e identificadas como *I. orientalis*, *T. delbrueckii* y *C. glabrata*; ninguna de las cepas reprodujo ni olor ni gas, por lo que parece probable que, aún en el caso de que no fueran eliminadas durante la manufactura de los productos, no serían capaces de producir la alteración de los mismos.

En la Tabla 15 se reflejan los resultados de la reproducción del efecto por parte de las levaduras aisladas de otros productos altamente azucarados. Se observa que ni las cepas de *P. guilliermondii* (38E1-38E4) ni las de *S. octosporus* (39E2-39E4) reprodujeron el olor característico ni produjeron gas en cantidad apreciable. Esto es lógico si se admite que el preacondicionamiento es necesario para el desarrollo de esta alteración, pues estas cepas, al menos en el transcurso de este trabajo, no han estado en contacto con el conservante.

Tanto *P. guilliermondii* como *S. octosporus* son fermentativas, y además osmotolerantes, como ya se ha mencionado en apartados anteriores. La ausencia de gas procedente de fermentación parece deberse al efecto inhibitorio del sorbato sobre la fermentación que se expuso para el caso de *S. cerevisiae*.

Respecto a la reproducción del olor a "petróleo" por los hongos (H1-H6), recogida en la Tabla 16, los resultados coinciden con el hecho conocido, citado en este mismo apartado, de que algunos mohos pertenecientes al género *Penicillium*, agrupados en las especies *P. chrysogenum*, *P. crustosum* y *P. simplicissimum*, son capaces de descomponer el sorbato en CO₂ y 1,3-pentadieno. Puesto que el olor del metabolito recuerda al del "petróleo", se puede suponer que las cepas de este trabajo, tanto levaduras como mohos, son capaces de descarboxilar el sorbato y producir este mismo compuesto, aunque es necesaria la identificación del mismo, como se detallará en el Apartado V.5.

En las muestras M11 y M35, de las que se aislaron mohos y levaduras (Tabla 4 de Material y métodos), la alteración evidente -gas y reblandecimiento-, se debe a la proliferación de las levaduras, como se discutió anteriormente. Sin embargo, la presencia de hongos filamentosos en estas muestras (H1 y H2 en M11, y H5 en M35) puede contribuir hasta cierto punto a la producción del olor a "petróleo" aún cuando no desarrollen micelio en el sustrato, ya que en las muestras M17, M34 y M36, los hongos aislados (H4, H3 y H6, respectivamente) fueron los únicos organismos responsables de la producción del olor a "petróleo" y tampoco desarrollaron micelio visible. En este sentido, Marth *et al.* (1966) apuntaron la posibilidad de que la descarboxilación del sorbato pueda preceder al crecimiento visible del hongo.

La Tabla 27 recoge las especies del género *Penicillium* en las que se ha estudiado este mecanismo de destoxificación del sorbato.

En las especies *P. chrysogenum* (cepas H1, H3, H4 y H5) y *P. crustosum* (cepa H2) ya se había detectado por tanto la capacidad de descarboxilación del sorbato. Por el contrario, este trabajo constituye la primera referencia en la especie *P. simplicissimum* y de esta capacidad en el género *Aspergillus*.

Tabla 27.- Producción de pentadieno por algunas especies de *Penicillium*

Especie	Pentadieno
<i>P. bilaii</i>	- ^d
<i>P. brevicompactum</i>	+ ^d
<i>P. chrysogenum</i>	+ ^a
<i>P. citrinum</i>	+ ^d
<i>P. commune</i>	+ ^d
<i>P. crustosum</i>	+ ^{b, c, d}
<i>P. cyclopium</i>	+ ^{b, c}
<i>P. fellutanum</i>	- ^d
<i>P. glabrum</i>	+ ^{a, -d}
<i>P. lanoso-viride</i>	+ ^{b, c}
<i>P. melanchorum</i>	+ ^d
<i>P. palitans</i>	+ ^d
<i>P. paxillii</i>	+ ^d
<i>P. puberulum</i>	+ ^{b, c}
<i>P. roqueforti</i>	+ ^{a, b, c}
<i>P. viridicatum</i>	+ ^{b, c}

Datos de Marth *et al.*^a (1966), Finol *et al.*^b (1982), Liewen y Marth^c (1985b) y Kinderlerer y Hatton^d (1990).

V.3.2.- Reproducción de las licuefacciones puntuales

La reproducción de las licuefacciones puntuales se realizó con los cuatro primeros aislamientos de las dos muestras analizadas: 34E1(1) y 34E1(2) (M32), y 35E1(1) y 35E1(2) (M33).

La inoculación de las cepas seleccionadas en el mismo sustrato del que fueron aisladas produjo el efecto que se muestra en la Fotografía 20. La reproducción *in situ* de la alteración, revela que ésta se debe al desarrollo de *Z. rouxii*.

De los medios que imitaban el sustrato original, recogidos en la Tabla 17, cabe destacar en primer lugar el viraje de los cuatro indicadores, añadidos al medio con 66% (p/v) de sacarosa, a su forma ácida. Por otra parte, y como muestra la Fotografía 21, sólo se manifiesta la licuefacción de la textura cuando en el medio sólido se añade una concentración elevada de sacarosa (66% p/p) y se suprime el agar.

De las actividades enzimáticas estudiadas, recogidas en la Tabla 18, se puede deducir que el fenómeno de licuefacción no se debe a lipólisis, proteólisis, amilólisis o proteólisis, al menos en las condiciones ensayadas.

Los resultados de ambas tablas permiten establecer que esta característica alteración es una manifestación más de una alteración típica por levaduras osmotolerantes, es decir, pérdida de masa sólida y alteración de la solubilidad de los solutos, lo que provoca el incremento de humedad y a_w (Tilbury, 1976; Restaino *et al.*, 1983; Jermini *et al.*, 1987). Este efecto quedaría enmascarado por la presencia de agar en los medios experimentales, ya que forma una estructura rígida que no permitiría observar la desestructuración del sustrato por pérdida de masa sólida. También se deduce que los resultados de estos ensayos no son afectados por la presencia o ausencia de sorbato en los medios.

El metabolismo microbiano en general implica la liberación de agua, hecho que incrementa localmente la a_w y acelera por tanto la tasa de crecimiento del organismo causante de la alteración (Tilbury, 1976). En este caso, la zona puntual de mayor humedad correspondería a las zonas circulares que se aprecian en las fotografías de las muestras.

Ya se hizo referencia en el Apartado V.1.1 a la incapacidad de las cepas de *Z. rouxii* para asimilar la sacarosa. Inicialmente, el metabolismo de las cepas aisladas de estas muestras alteradas tendría lugar a partir de la proporción de jarabe de glucosa que se incorpora en la masa de mazapán como humectante, sustituyendo a la sacarosa: un 3%, según datos de la empresa productora de mazapán. Llama la atención el hecho de que los azúcares mayoritarios de este jarabe, glucosa y maltosa (ver Apartado III.1 de Material y métodos), son fermentados vigorosamente por *Z. rouxii*; de hecho, la fermentación de la maltosa es una de las principales características para la identificación de esta especie (Jermini *et al.*, 1987).

A partir de estos azúcares comienza el desarrollo de *Z. rouxii*. En su metabolismo las células liberan ácidos, como pone de manifiesto el viraje de los indicadores en el medio altamente azucarado, resultado de la Tabla 17 que ya se ha discutido. Este ácido, debido a que el sustrato es muy compacto, a diferencia de otros productos a base de mazapán descritos, puede acumularse en la zona circundante al crecimiento de la levadura si no difunde a través del sustrato, y esta acumulación puntual de ácido va a tener un doble efecto. Por una parte, sobre la **pectina**, que es una sustancia compleja de elevado peso molecular que se encuentra naturalmente en todos los tejidos vegetales (Olliver, 1962), como puede ser la almendra, uno de los componentes mayoritarios de la pasta de almendra; la pectina contiene ácidos pectínicos, capaces de formar un gel con azúcar y ácido, siendo la óptima proporción de estos componentes de 66% de azúcar, 1% de ácido y 1% de pectina (Ranken, 1993). Este fenómeno daría cuenta de parte de la licuefacción puntual del sustrato que tiene lugar.

Por otra parte, cuando se hierve una solución de azúcar en agua, se invierte una pequeña cantidad de azúcar, dependiendo de la acidez de la solución y del tiempo de calentamiento. Cuando éste es intenso y prolongado, la D-fructosa (levulosa) del azúcar invertido se descompone y da lugar a ácido levulínico, que además de formar compuestos coloreados, eleva el punto de acidez de la solución, lo que motiva el desdoblamiento de mayor cantidad de sacarosa (Ranken, 1993).

Este efecto explicaría el hecho de que *Z. rouxii* sea capaz de crecer en soluciones de sacarosa como son el medio experimental para la detección del olor a "petróleo". Aplicado a sustratos sólidos, tanto el pretratamiento térmico equivalente a una pasterización que se aplica a la masa cruda de mazapán (ver Apartado III.1 de Material y métodos) como la esterilización en autoclave del medio donde se reprodujo la alteración daría lugar a la conversión de parte de la sacarosa en glucosa y fructosa. Estos azúcares simples, junto con otros integrantes del jarabe de glucosa empleada en la fabricación de la pasta de almendra, como se ha descrito en este mismo apartado, son sustrato para el crecimiento de *Z. rouxii*, cuyo metabolismo, con producción de ácidos, sería responsable de la inversión de mayor cantidad de sacarosa.

Respecto a otras referencias de alteraciones similares a ésta, cabe destacar dos. Una de ellas se ha encontrado en aceitunas, sobre las cuales ciertas levaduras fermentativas y pectinolíticas producen reblandecimiento y formación de bolsas de gas en los frutos; este efecto, junto con la producción de depresiones bajo y alrededor de las colonias individuales debido a la pectinólisis, dan lugar a una alteración que por su geometría característica se ha denominado "ojo de pez" (Vaughn *et al.*, 1972). Por otra parte, se ha detectado en fresas la presencia de la levadura *Kloeckera apiculata*, que se multiplica en zonas dañadas de la fruta hasta desarrollar una masa color crema que crece hasta formar un cráter (Tudor y Board, 1993). La masa color crema, en la pasta de almendra, correspondería a la zona de crecimiento de *Z. rouxii*, en el punto central de la licuefacción, cuyo color se asemejaría al de la pasta sin alterar.

V.4.- CMI de sorbato para cepas seleccionadas

La determinación de la concentración de sorbato capaz de inhibir las cepas es fundamental a la hora de investigar las alteraciones que pueden producir los organismos en presencia del conservante.

El estudio de la CMI de sorbato se limitó a algunas cepas de levaduras representativas de las especies consideradas resistentes. Respecto a la CMI para las cepas y especies de hongos filamentosos aislados en este trabajo, cabe mencionar que, en general, las especies de *Penicillium* son muy resistentes al sorbato, resistencia que se puede atribuir a su capacidad de descarboxilar el compuesto (Skirdal y Eklund, 1993). Así, Liewen y Marth (1985a) hacen referencia a cepas estudiadas por Marth *et al.* (1966) de la especie *P. roqueforti* capaces de crecer en presencia de 5,4 y hasta 7,1 g/L de sorbato; estas cepas habían sido aisladas de quesos tratados con sorbato. Posteriormente, Finol *et al.* (1982) encontraron cepas de *P. cyclopium*, *P. puberulum* y *P. roqueforti* capaces de crecer frente a concentraciones de sorbato tan elevadas como 12, 12 y 10 g/L, respectivamente. Para *P. crustosum*, Kinderlerer y Hatton (1990) calculan una CMI de sorbato de 1,25 g/Kg, pero Finol *et al.* (1982) estudiaron cepas de esta especie capaces de crecer en presencia de 7 g/L del conservante. Por otra parte, Liewen y Marth (1985a) encontraron que el género *Aspergillus* es generalmente más sensible al sorbato que el género *Penicillium*, y calcularon,

como concentración máxima del conservante que permitió el crecimiento de *A. niger*, tan sólo 0,5 g/L.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de ácido sórbico se escogieron las siguientes cepas: 1E, 2E, 3E, 10E, 14D, 24E1, 26E1, 32E1, correspondientes a primeros aislamientos de las especies productoras de olor a "petróleo". Lo más destacado de la Tabla 19, que recoge las CMI determinadas para cepas de *Z. rouxii* (cepas 1E, 2E, 14D, 24E1, 26E1, y 32E1) y de *D. hansenii* (cepas 3E y 10E), es la diferencia de valores existente cuando las cepas crecen en 1 y 60% (p/v) de glucosa. Para todas las cepas ensayadas, la CMI en medio base con 1% de glucosa fue $\leq 0,5$ g/L; sin embargo, cuando el medio base contiene 60% de glucosa, la CMI, es decir, la concentración de sorbato necesaria para inhibir el crecimiento, fue muy superior para todas las cepas, independientemente de que pertenezcan a *Z. rouxii* o a *D. hansenii*. Puesto que en la fabricación de mazapán se emplea una dosis de 1 g/L de ácido sórbico y la concentración de azúcar es similar a la del segundo medio base, es lógico que la CMI para las cepas que han alterado estos productos -cepas 1E a 26E1- sea cercana o incluso superior a este valor. Incluso la cepa 32E1, aislada de pasteles de yema sin alterar (muestra M30), no es inhibida por 1 g/L de sorbato pues la CMI de conservante para esta cepa es 1,2 g/L, lo que es indicativo de que el producto puede ser alterado con el transcurso del tiempo.

Respecto a las diferencias de la CMI en 1 y 60% de glucosa, los resultados confirman el hecho, expuesto en el Apartado I.2.1 de la Introducción, de que la tolerancia al sorbato por *Z. rouxii* se incrementa cuanto más baja es la a_w del sustrato. Este efecto se debería a un cambio en los componentes de la pared celular y de los lípidos de la membrana, que provocaría un cambio en la permeabilidad celular al sorbato, asociado al modelo propuesto para la resistencia al sorbato por esta levadura, según el cual sus células se encogen en respuesta a la baja a_w , con lo que el tamaño de poro disminuye y se dificulta el influjo de sorbato. Otras hipótesis acerca de este comportamiento se refieren en el mismo apartado de la Introducción.

La influencia de la concentración de azúcar sobre la resistencia al sorbato se estudió cualitativamente mediante el siguiente experimento: se sembraron dos cepas de *D. hansenii*

-cepas 3E y 4E- y seis de *Z. rouxii* -cepas 1E, 2E, 14D, 15D, 35E1(1) y 36E1- en medio YMA en tres condiciones distintas: 1% (p/v) de glucosa y 0,05% de sorbato potásico; 60% (p/v) de glucosa y 0,05% de sorbato potásico; 60% (p/v) de glucosa y ausencia de conservante. Las cepas de *D. hansenii* produjeron olor a "petróleo" en presencia de conservante en ambas concentraciones de glucosa, pero no en ausencia del mismo, resultados que coinciden con los encontrados previamente (Casas *et al.*, 1996). Sin embargo, todas las cepas de *Z. rouxii* mostraron un comportamiento distinto: produjeron olor a "petróleo" en presencia del conservante sólo cuando el medio contenía 60% de glucosa, pero no, sorprendentemente, cuando la concentración de azúcar era del 1%, ni, por supuesto, en ausencia de sorbato. Respecto a la producción de gas por parte de *Z. rouxii*, ésta fue muy elevada en el medio con 60% de glucosa y en ausencia de conservante, lo cual es indicativo de una gran actividad fermentativa; en presencia de 0,05% de sorbato, la producción de gas fue también moderadamente elevada cuando el medio contenía 60% de azúcar, pero para la misma concentración de sorbato y un 1% de glucosa, la producción de gas fue muy escasa. Estos resultados ponen de manifiesto que en *Z. rouxii* existe una estrecha relación entre capacidad de resistencia al sorbato y actividad fermentativa, aunque se desconoce si la explicación a esta relación reside en alguna de las hipótesis planteadas anteriormente. Marth *et al.* (1966) dedujeron de sus estudios con cepas de *P. roqueforti* que los sustratos altamente nutritivos favorecen la rápida y completa eliminación del sorbato por parte del hongo, lo que concuerda con el efecto encontrado en *Z. rouxii*.

V.5.- Identificación de pentadieno como compuesto responsable del olor a "petróleo"

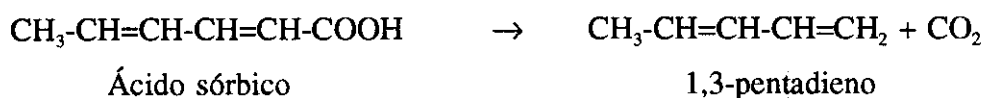
El análisis de 1,3-pentadieno se llevó a cabo sobre las cepas de levadura productoras del olor a "petróleo" correspondientes a los primeros aislamientos (1E, 2E, 14D, 24E1, 26E1, 32E1, 34E1(1), 35E1(1) y 36E1 de *Z. rouxii*, y 3E, 4E y 10E de *D. hansenii*), y los hongos aislados (H1 a H7).

Como ya se ha descrito previamente, algunos hongos del género *Penicillium* y las bacterias lácticas son capaces de degradar por descarboxilación el sorbato a 1,3-pentadieno, que posee un característico olor a "petróleo". El metabolito volátil producido por las levaduras y hongos filamentosos aislados en este trabajo, que posee el mismo olor, ha sido

también identificado como 1,3-pentadieno mediante sus cromatogramas y espectros de masas, que se muestran en las Figuras 3 a 9. Se trata pues de la primera referencia de la capacidad de descarboxilación del sorbato en dos especies de levaduras, *Z. rouxii* y *D. hansenii*, y en dos especies de hongos filamentosos, *P. simplicissimum* y *A. niger*.

De los cromatogramas del gas de cabeza de algunos cultivos cabe también destacar que no se consiguió la separación total de los compuestos. En el cromatograma 3a, correspondiente a la cepa 1E de *Z. rouxii*, se observan picos interferentes con el de 1,3-pentadieno, que corresponden a productos de fermentación del azúcar por parte de la levadura: CO₂ y etanol. Como los mohos no son fermentativos, y *D. hansenii* tampoco produce gas en cantidad apreciable, como ya se discutió en el Apartado V.3.1, no aparecieron estas interferencias en el pico del 1,3-pentadieno.

Ya que el ácido sórbico puede penetrar continuamente a través de la membrana celular de la levadura, los mecanismos de resistencia descritos en el Apartado I.3.2 de la Introducción, como la extrusión de protones a expensas de un aumento en la actividad de la ATPasa de membrana, terminarían por agotar las reservas energéticas de la célula (Cole y Keenan, 1987). Por tanto, el desarrollo de un sistema de **degradación** del sorbato, como su descarboxilación, sería más rentable energéticamente.



Además del pentadieno, se han identificado otros derivados del ácido sórbico como productos de destoxificación. Estos productos, generados por algunos mohos y/o bacterias lácticas, son el resultado de ciertas reacciones de esterificación, reducción y formación de éter que afectan al grupo carboxilo, altamente reactivo, del ácido sórbico (Kinderlerer y Hatton, 1990). En bacterias, se han encontrado varios derivados volátiles procedentes de la degradación del ácido sórbico en vinos producida por bacterias lácticas, ocasionando una pérdida de calidad de estos vinos. La degradación comienza con la reducción del sorbato al correspondiente alcohol, es decir, hexadienol, el cual reacciona con el etanol para rendir una serie de compuestos responsables de la aparición de un olor descrito como a "geranio"

(Liewen y Marth, 1985a; Sofos, 1989; Kinderlerer y Hatton, 1990; Sofos y Busta, 1993). Por tanto, parece evidente que el grupo carboxilo libre es necesario para la actividad antimicrobiana del sorbato, y así, los microorganismos que han desarrollado un mecanismo de destoxificación lo hacen suprimiendo químicamente el grupo carboxilo cargado (Kinderlerer y Hatton, 1990).

Dentro de los hongos filamentosos, la capacidad de destoxificación del sorbato por conversión en 1,3-pentadieno parece estar restringida al género *Penicillium*; este sistema de destoxificación permite a algunos *Penicillium* crecer en presencia de niveles de sorbato hasta de 1,2 g/L (Kinderlerer y Hatton, 1990). En 1966, Marth *et al.* fueron los primeros en estudiar este fenómeno en cuatro especies de *Penicillium*: *P. roqueforti*, *P. notatum*, *P. frequentans* y *P. cyaneo-fulvum*, aisladas de quesos tratados con sorbato que desprendían un característico olor a "hidrocarburo". Actualmente estas especies, a excepción de *P. roquefortii*, han sufrido un cambio en su taxonomía: *P. frequentans* es sinónimo de *P. glabrum* (Pitt, 1991), *P. notatum* se incluye en la especie *P. chrysogenum* (Ramírez, 1982; Pitt, 1991) y *P. cyaneo-fulvum* también forma parte de la especie *P. chrysogenum* (Ramírez, 1982). La capacidad de estas y otras especies capaces de producir pentadieno ya se ha descrito en la Tabla 27 de Discusión.

Por tanto, las cepas H1, H3, H4 y H5, identificadas en este trabajo como *P. chrysogenum*, pertenecen a una de las especies en las que primero se describió el sistema de destoxificación del ácido sórbico por descarboxilación a pentadieno, y representan la especie mayoritaria, con 4 aislamientos de 7.

La cepa H2 fue identificada dentro de otra especie productora de pentadieno, *P. crustosum*. Kinderlerer y Hatton (1990) estudiaron 7 cepas de *P. crustosum* y todas fueron capaces de descarboxilar el sorbato; aunque dentro de una misma especie de hongo hay cepas extremadamente resistentes al ácido sórbico mientras que otras son sensibles al mismo, *P. crustosum* parece ser una de las especies más resistentes al conservante. Liewen y Marth (1985a) estiman una concentración máxima de sorbato potásico que permite el crecimiento de *P. crustosum* de 6 g/L a 25°C y 2 g/L a 4°C, mientras que para *P. chrysogenum* y *P. notatum*, actualmente sinónimo de la anterior, estas concentraciones se

reducen a 0,5 g/L a cualquiera de las dos temperaturas. La variación de la tolerancia al sorbato en función de la temperatura se explica por el hecho de que, generalmente, las temperaturas fuera del rango óptimo para el crecimiento de cualquier microorganismo incrementan la efectividad del sorbato para inhibir su crecimiento (Liewen y Marth, 1985a; Sofos, 1989). Esta influencia de la temperatura en la efectividad del sorbato debe, por tanto, tenerse en cuenta a la hora de establecer la temperatura de almacenamiento de los alimentos tratados con este conservante (Finol *et al.*, 1982).

Respecto a la tercera especie identificada, *P. simplicissimum* (H6), no se han encontrado referencias anteriores sobre su capacidad de producción de pentadieno, pese a ser, como ya se ha dicho, una especie contaminante muy común en diferentes sustratos como suelos y materiales en descomposición (Pitt, 1991). No obstante, es posible que esta ausencia de referencias se deba a una distinta interpretación respecto a la taxonomía.

Marth *et al.* (1966) no establecieron en su estudio si los hongos obtienen energía a partir del ácido sórbico mediante su descarboxilación, o si el único beneficio derivado de esta reacción es modificar el conservante, inactivándolo de manera que permita su crecimiento. Se conoce además muy poco acerca de la conversión del sorbato en 1,3-pentadieno, respecto a la ruta metabólica y enzimas implicadas. Una serie de microfotografías electrónicas realizadas por Kinderlerer y Hatton (1990) en micelio de *Penicillium crustosum* crecido en presencia de ácido sórbico no proporcionaron ninguna evidencia acerca de la localización celular donde tiene lugar la conversión del conservante en 1,3-pentadieno.

Por último, se desconoce si la capacidad de degradación de sorbato se debe exclusivamente a la exposición continuada al conservante, como se refirió en el Apartado I.3.2 de la Introducción, o si existe alguna determinación genética que confiera sólo a ciertas cepas de microorganismos esta capacidad de degradación. Marth *et al.* (1966) estudiaron el comportamiento de *P. roqueforti*, un contaminante común de los quesos, que resultó ser la especie de *Penicillium* más resistente al sorbato entre las que estudiaron estos autores; éstos proponen que *P. roqueforti* puede haber desarrollado esta resistencia a través de la prolongada exposición al sorbato, ya que el tratamiento de los quesos con este

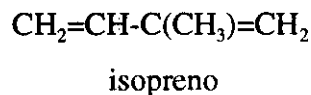
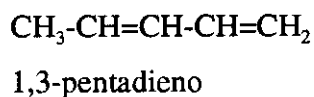
conservante es una práctica muy frecuente. Posteriormente, Finol *et al.* (1982) aislaron de quesos algunas cepas de *Penicillium* que resistían concentraciones bastantes superiores de sorbato; puesto que las queserías de origen eran distintas en los dos estudios, estos autores no pueden asegurar que se desarrolle una flora fúngica resistente al sorbato en estas factorías donde se emplea constantemente este conservante, aunque admiten esta posibilidad. Asimismo, como las especies de *Penicillium* identificadas en ambos estudios eran diferentes excepto *P. roqueforti*, como se refleja en la Tabla 27, los autores deducen que la capacidad de metabolizar el sorbato no está restringida a unas pocas especies de *Penicillium*.

Se ha descrito que, a diferencia de los hongos del género *Penicillium*, los del género *Aspergillus* no son capaces, en general, de descarboxilar el sorbato. Kinderlerer y Hatton (1990) investigaron esta capacidad en 15 cepas xerotolerantes del género *Eurotium*, perteneciente al grupo de *Aspergillus glaucus*, y tan sólo una cepa perteneciente a la especie *E. repens* fue capaz de producir una pequeña cantidad de pentadieno. Sin embargo, la cepa de *A. niger* (H7) aislada en este estudio fue capaz de descarboxilar el sorbato aunque se aisló de una muestra de miel (M39), como se cita en la Tabla 6 de Material y métodos, y por tanto no había tenido lugar un contacto previo con el conservante, al menos en el curso de este trabajo.

Según señalan Marth *et al.* (1966), el ácido sórbico ejerce un efecto fungistático sobre *A. niger* a través de la inhibición de la actividad catalasa. Por su parte, Liewen y Marth (1985a) establecen una concentración máxima de sorbato potásico que permite el crecimiento de *A. niger* de 0,5 g/L a 25°C, mientras que a 4°C esta misma concentración de sorbato inhibe por completo el crecimiento, variación debida al efecto de la temperatura que ya se ha apuntado. Aunque Sofos (1989) y Sofos y Busta (1993) refieren la existencia de cepas de *Aspergillus* capaces de degradar el sorbato, no especifican a qué especies pertenecen estas cepas, ni si la degradación del compuesto produce pentadieno como metabolito final. Así, sería ésta la primera ocasión en que se ha aislado una cepa de *A. niger* productora de pentadieno sin haber existido además exposición previa al sorbato. Esta característica convierte a *A. niger* en una nueva especie peligrosa que debe considerarse en cuanto a la conservación de los alimentos mediante su tratamiento con sorbato.

Como en el caso de los mohos, los resultados en levaduras no permiten afirmar si la capacidad de resistencia al sorbato está restringida genéticamente a cepas de las especies *Z. rouxii* y *D. hansenii*, que de esta manera han sobrevivido en presencia del conservante, o bien su capacidad de multiplicarse en un medio altamente azucarado ha permitido que, tras el contacto repetido con el conservante, hayan desarrollado la capacidad de degradarlo, llegando en cualquiera de los dos casos a alterar el alimento.

Cabe mencionar un trabajo realizado por Berenguer *et al.* (1991) en el que se describe la alteración de un producto de bollería -sobao pasiego- consistente en la emisión de un olor intenso a "hidrocarburo", que puede asociarse a la alteración de los productos de mazapán descrita en este trabajo. Los autores atribuyen la aparición de este olor a la producción de **isopreno** por mohos contaminantes del producto pertenecientes al género *Eurotium*. Como puede observarse en el cromatograma 2a y su correspondiente espectro, 2b, tanto el tiempo de retención -1,8 minutos- como la fragmentación m/z del isopreno (2-metil 1,3-butadieno) son prácticamente coincidentes con los del 1,3-pentadieno, ya que la estructura del primer compuesto es similar a la del segundo, ramificada:



Esta coincidencia no permitiría en principio afirmar que el compuesto responsable del olor a "petróleo" de las muestras de mazapán sea realmente 1,3-pentadieno, y la imprecisión implica una importante consecuencia respecto a la ruta a través de la cual se forma el compuesto. Si se trata de pentadieno, tal y como se ha descrito previamente, el microorganismo en cuestión sería capaz de descarboxilar el ácido sórbico a una forma inactiva, superando así la inhibición por el conservante. Sin embargo, tratándose de isopreno, cabría deducir que la presencia de sorbato induce una ruta metabólica especial que no implica la degradación del conservante.

El isopreno es un metabolito sillar de muchas sustancias naturales de origen vegetal, entre otras, los precursores de las cuatro vitaminas liposolubles: carotenoides vegetales (precursores de la vitamina A), ergosterol de levaduras y otros hongos (precursor de la

vitamina D₂ o ergocalciferol), tocoferoles (precursores de la vitamina E) y naftoquinonas (precursoras de la vitamina K) (Lehninger *et al.*, 1995). Berenguer *et al.* (1991) no especifican el precursor ni la ruta de producción de isopreno por parte de los mohos aislados, ni la causa de acumulación de este metabolito, que da lugar a la aparición del olor característico. Tampoco indican si se ha empleado sorbato en la fabricación del producto alterado, dato fundamental si tenemos en cuenta que en este trabajo la presencia del conservante es imprescindible para la producción del olor a "petróleo", tanto por parte de las levaduras (Casas *et al.*, 1996) como de los hongos filamentosos (Liewen y Marth, 1985a). Previamente, Liewen y Marth (1985b) ya habían comprobado que aquellos hongos inoculados en YMB en presencia de sorbato producían pentadieno, mientras que en el mismo medio pero en ausencia del conservante no se detectaba presencia de pentadieno.

Como señalan Marth *et al.* (1966) o Liewen y Marth (1985b), la producción de 1,3-pentadieno por parte de *Penicillium* viene acompañada por un descenso en la concentración de sorbato. La desaparición de sorbato en el medio es, por tanto, el hecho que permitirá afirmar que el compuesto volátil responsable del olor a "petróleo" i) se produce a expensas de la degradación del sorbato; ii) es pentadieno y no isopreno, ya que es el primero de ellos el que tiene una estructura lineal como el sorbato, mientras que la del segundo compuesto es ramificada.

La producción de 1,3-pentadieno a partir de sorbato se cuantificó, midiendo la aparición e incremento del primero y la disminución del segundo, así como el incremento del número de células, en dos cepas, 1E y 3E, representantes de las dos especies productoras del olor a "petróleo", *Z. rouxii* y *D. hansenii*, respectivamente.

V.5.1.- Cuantificación de sorbato

Respecto a la técnica de cuantificación de sorbato mediante HPLC, debe mencionarse que fueron necesarios varios ensayos para lograr establecer unas condiciones cromatográficas adecuadas, en referencia al tipo de columna seleccionada, así como a la fase móvil empleada y la velocidad de flujo de la misma. Dichas condiciones permitieron, en primer lugar, obtener tiempos de retención del compuesto patrón -21,17 minutos- (Figura

10) reproducibles en las sucesivas inyecciones de extractos procedentes del medio experimental sin inocular (Figura 11), o inoculado e incubado durante cuatro días con la cepa 1E de *Z. rouxii* (Figura 12) y con la cepa 3E de *D. hansenii* (Figura 13). Por otra parte, en el metabolismo de las levaduras, además de CO₂ y etanol, se producen una serie de productos secundarios finales como alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, aldehídos y sustancias cetogénicas (Fleet, 1992), algunos de los cuales pueden interferir al absorber a longitudes de onda cercanas a la fijada para la detección por UV del ácido sórbico ($\lambda = 264$ nm). La correcta puesta a punto de la técnica condujo a la eliminación prácticamente total de picos interferentes con los del ácido sórbico.

Cabe también destacar una diferencia notable entre el cromatograma obtenido a partir del compuesto patrón (Figura 10) y los obtenidos de la inyección de los extractos de los medios de cultivo (Figuras 11, 12 y 13). En el primero se trata de un pico único, mientras que en el resto el pico principal, con el mismo tiempo de retención que el patrón, aparece precedido por un pico de menor altura que no llega a separarse del segundo. Esta diferencia se debe a la naturaleza de los reactivos empleados; para la preparación del patrón se empleó ácido sórbico de alta pureza, mientras que en los medios de cultivo el conservante se añadió en forma de sal potásica de calidad comercial. Durante el proceso de preparación de las muestras para HPLC, como se describió en el Apartado III.9.2.1.1 de Material y métodos, la sal sódica se transforma en su forma ácida, de ahí que fuera necesario aplicar un factor de corrección en el cálculo de la concentración extraída de sorbato potásico a partir de la concentración medida en forma ácida. La adición de sal potásica de baja pureza puede dar lugar a la detección cromatográfica de un isómero minoritario cuyo pico no se separa del pico principal, y cuyo área se sumó a la del compuesto mayoritario a la hora de calcular la concentración de sorbato extraída de las muestras.

La Tabla 21 muestra la cuantificación de sorbato en el medio tras la incubación de las cepas de levadura 1E de *Z. rouxii* y 3E de *D. hansenii* en presencia de distintas concentraciones de sorbato. Como puede observarse, las concentraciones iniciales -0,25, 0,50 y 1,00 g/L (equivalentes a 250, 500 y 1000 ppm) se redujeron, respectivamente, hasta 1,60, 3,14 y 9,85 ppm para 1E y 3,18, 4,43 y 5,23 ppm para 3E, lo que demuestra que las

levaduras han sido capaces de destoxificar casi en su totalidad el conservante y lo ha transformado en pentadieno, siendo ésta una (capacidad) que hasta el momento no se había encontrado en levaduras.

V.5.2.- Producción de pentadieno

Se puede observar que tanto la cepa 1E de *Z. rouxii* (Tabla 22) como la cepa 3E de *D. hansenii* (Tabla 23) produjeron 1,3-pentadieno en una cantidad creciente a lo largo del período de incubación. El primer aspecto a destacar de ambas tablas es que ninguna de las dos cepas produjo pentadieno hasta el segundo día de incubación, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el diseño de la prueba estandarizada para la detección de olor a "petróleo" que se describirá en el apartado siguiente.

Por otra parte, también se observa que cuanto mayor es la concentración de sorbato añadida al medio, la cantidad de pentadieno producido tras finalizar el período de incubación es superior. Los valores finales de pentadieno corresponden a la transformación casi completa del sorbato en pentadieno, como ya se ha discutido, pero las determinaciones de pentadieno durante el período de incubación (días 2 y 3) revelan que no sólo los valores finales, sino también los iniciales e intermedios, son directamente proporcionales a la concentración de sorbato del medio. Estos resultados sugieren que, para superar la inhibición que ejerce el sorbato sobre las levaduras, éstas desarrollan un mecanismo de degradación del mismo, que será tanto más activo cuanto mayor sea la concentración del conservante presente en el medio, de manera que éste sea eliminado en el menor tiempo posible y la levadura pueda crecer en el medio, una vez que este proceso de destoxificación haya tenido lugar.

Por último, se pueden comparar los valores finales de pentadieno medidos en los medios inoculados con la cepa 1E de *Z. rouxii* (3,91, 7,27 y 11,11 μL) y los correspondientes inoculados con la cepa 3E de *D. hansenii* (2,82, 4,85 y 19,44). Para las concentraciones iniciales de 0,25 y 0,50 g/L de sorbato, la cantidad de pentadieno producida por *Z. rouxii* fue aproximadamente el doble de la producida por *D. hansenii*, mientras que frente a una concentración inicial de 1,00 g/L de sorbato fue la cepa 3E la

que produjo casi el doble de pentadieno. Estos valores concuerdan con las concentraciones de sorbato remanentes en estos medios, reflejadas en la Tabla 21, y sugiere que la primera especie, en presencia de la concentración más elevada de sorbato, necesita transformar menor cantidad del conservante en pentadieno.

V.5.3.- Recuentos celulares

Las Tablas 24 y 25 muestran los recuentos de células para las cepas 1E de *Z. rouxii* y 3E de *D. hansenii*, respectivamente, antes de la incubación y tras cuatro días de incubación en ausencia de sorbato y en presencia de tres concentraciones crecientes de sorbato. Se puede observar, en primer lugar, que el número de células que se inoculó de cada cepa aumentó una unidad logarítmica tras el período de incubación. Los recuentos de la cepa de *Z. rouxii*, habiendo inoculado los medios con $4,0 \times 10^5$ UFC/mL, tras la incubación en presencia de 0,25, 0,50 y 1,00 g/L de sorbato, fueron muy similares: $3,6$, $4,0$ y $4,0 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente; en ausencia de sorbato, el número de células tras la incubación fue de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. En el caso de la cepa de *D. hansenii*, de la que se inocularon $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, los recuentos en presencia de las concentraciones crecientes de sorbato también fueron muy similares: $1,5$, $1,0$ y $1,6 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente; en ausencia de sorbato, el número de células se incrementó hasta $7,5 \times 10^7$ UFC/mL, valor aproximadamente cinco veces superior que en presencia de sorbato.

Cuando las levaduras crecen en presencia de ácido sórbico, se produce un aumento en la duración de la fase de latencia durante la cual, como mecanismo de resistencia al conservante, los protones deben ser bombeados por la ATPasa de membrana (Cole y Keenan, 1987; Stratford y Anslow, 1996). La duración de la fase de latencia depende por tanto de la severidad del estrés producido por el ácido (Holyoak *et al.*, 1996), aumentando ésta exponencialmente con la concentración de ácido sórbico (Neves *et al.*, 1994). En este trabajo, al no haberse realizado curvas de crecimiento con recuentos intermedios de células durante el período de incubación, no se ha estudiado este efecto. Sin embargo, el estudio estadístico sí desveló una importante discrepancia en el comportamiento en presencia de sorbato entre las cepas 1E de *Z. rouxii* y 3E de *D. hansenii* atendiendo a los recuentos antes y después de la incubación. En el caso de *Z. rouxii*, el análisis de la varianza no

reveló ninguna diferencia significativa dentro del conjunto de recuentos. Este hecho pone de manifiesto que la presencia de sorbato, en cualquiera de las tres concentraciones ensayadas, no ejerce ningún efecto apreciable sobre el crecimiento de la levadura, pues éste no disminuye sensiblemente respecto al crecimiento en el mismo medio sin sorbato.

Por el contrario, el mismo análisis estadístico aplicado a los recuentos de *D. hansenii* sí reveló la existencia de diferencias significativas entre estos valores, diferencias que desaparecen al eliminar el valor correspondiente al recuento final de la levadura en el medio sin sorbato. Estos resultados se pueden interpretar como un cierto efecto inhibitorio del sorbato sobre el crecimiento de *D. hansenii*, al menos la cepa estudiada, de igual magnitud independientemente de la concentración de conservante presente en el medio.

Así, aunque las dos especies de levadura se consideran resistentes al sorbato los resultados confirman el hecho conocido de la elevada resistencia de *Z. rouxii* a los ácidos débiles, en este caso al sorbato, pues la CMI calculada es de 1,2 g/L, como se muestra en la Tabla 19 de Resultados, y las concentraciones inferiores no son capaces de disminuir de forma apreciable el crecimiento de la misma. Sin embargo, *D. hansenii*, que presentó una CMI de sorbato de 0,9 g/L, que aparece en la misma tabla, consiguió alcanzar una población sensiblemente menor en presencia de concentraciones subinhibitorias del conservante, de manera que una concentración tan baja como 0,25 g/L fue capaz de provocar una disminución considerable en el crecimiento de esta levadura. En este sentido, cabe recordar de nuevo los resultados, que ya se han discutido, de las Tablas 22 y 23, en las que se recoge la cantidad de pentadieno producida por *Z. rouxii* (cepa 1E) y *D. hansenii* (cepa 3E) respectivamente, a partir de las mismas concentraciones iniciales de sorbato; en ellos ya se pone de manifiesto que la primera levadura necesita destoxificar menor cantidad de conservante al crecer en presencia de la mayor de las tres concentraciones ensayadas. No obstante, no parece adecuado realizar una generalización de estos resultados, pues sólo se llevó a cabo un experimento y con una única cepa de cada especie.

Una limitación muy importante al uso de sorbato es, por tanto, la **selección** de microorganismos resistentes al mismo que finalmente provocan la alteración del alimento en el que se desarrollan. Así, las medidas encaminadas a la prevención de estas alteraciones

deben dirigirse, en primer lugar, a impedir el contacto de estos microorganismos peligrosos con el alimento, principalmente a través de unas estrictas medidas de higiene, que deben aplicarse antes, durante y después de la fabricación de los productos.

V.6.- Prueba estandarizada

Mientras que la reproducción del olor a "petróleo" y/o gas se comprobó en todas las cepas aisladas, la prueba estandarizada se estableció con varios de los primeros aislamientos: 1E, 3E, 19D, 24E1, 26E1, 32E1, 35E1(2), representantes de las dos especies productoras de olor a "petróleo", *Z. rouxii* (1E, 19D, 24E1, 26E1, 32E1 35E1(2)) y *D. hansenii* (3E).

Los resultados de las distintas condiciones de inoculación y preincubación de las levaduras pusieron de manifiesto que para detectar con certeza el olor a "petróleo" es necesario un período de incubación de 24 horas en el medio con sorbato. La preincubación en YMB, independientemente de la duración de ésta, no redujo la duración de este período de incubación.

Asimismo, para la rápida reproducción del efecto es necesario inocular un número elevado de células, de manera que con la suspensión densa se consiguió una producción más rápida del olor a "petróleo" que con la inoculación de una colonia aislada. Para conseguir los mismos efectos con una colonia aislada, la placa debería incubarse durante un período de tiempo tal que la colonia estuviese muy desarrollada, lo que equivale, en términos de duración del ensayo, a resembrar en masa la levadura.

La utilidad de este ensayo de laboratorio es su aplicación a la industria. Realizando esta prueba en paralelo a los recuentos rutinarios en la industria, algunas levaduras potencialmente peligrosas, en número inferior al máximo permitido, pueden ser rápidamente detectadas, y el lote de productos retenido en la fábrica para evitar el deterioro posterior a su distribución y el rechazo por parte del consumidor.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- La levadura aislada con mayor frecuencia de productos altamente azucarados, principalmente productos de mazapán, es *Zygosaccharomyces rouxii*, que junto con algunas cepas de *Debaryomyces hansenii*, es responsable de la alteración de estos productos.
- 2.- La técnica de enriquecimiento en medios de cultivo con alta concentración de azúcar facilita la recuperación de levaduras osmotolerantes a partir de alimentos azucarados.
- 3.- El medio recomendado para inducir la esporulación en levaduras es el V8 diluido diez veces, que debe incubarse a temperatura subóptima -20°C- y durante un período de tiempo variable, dependiendo de la cepa. La observación microscópica debe realizarse con 1000 aumentos, no siendo necesario aplicar la técnica de tinción de esporas.
- 4.- Algunas cepas de levaduras y de hongos filamentosos son capaces de resistir elevadas concentraciones de sorbato en alimentos y sustratos altamente azucarados mediante la conversión del compuesto en un metabolito sin actividad antimicrobiana, identificado como 1,3-pentadieno. Este compuesto, que se genera por descarboxilación del sorbato, es el responsable de la aparición en ciertas muestras de un olor característico a "petróleo".
- 5.- Las cepas de levadura capaces de descarboxilar el sorbato a 1,3-pentadieno pertenecen a la especie *Z. rouxii* y *D. hansenii*, y las de hongos filamentosos a diversas especies del género *Penicillium* y a la especie *Aspergillus niger*. Esta capacidad ya había sido descrita en *Penicillium*, pero es la primera referencia de la misma en levaduras y en *A. niger*.
- 6.- El desarrollo de este mecanismo de resistencia, junto con la tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar, convierte a estas especies de levaduras y hongos filamentosos en organismos potencialmente peligrosos en cuanto a la conservación de los alimentos.
- 7.- La aparición de licuefacciones puntuales en pasta de almendra es una manifestación del desarrollo de *Z. rouxii* en presencia de elevadas concentraciones de azúcar y de sorbato; el metabolismo de la levadura genera humedad y da lugar a la pérdida de masa sólida alrededor de la zona de crecimiento, lo cual, junto con la aparición del característico olor a "petróleo", da cuenta de la alteración del producto.

8.- El diseño de una prueba rápida y sencilla para discriminar los microorganismos que toleran altas concentraciones de azúcar y son resistentes al sorbato resulta de gran utilidad para las industrias productoras de alimentos azucarados. Esta prueba puede ser incluida en el control de calidad rutinario y aplicarse a las levaduras y hongos filamentosos aislados en este tipo de análisis.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

Anand, J.C.; Brown, A.D. (1968) Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **52** (2), 205-212.

von Arx, J.A. (1981) *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. 3^a ed., J. Cramer, Vaduz.

Baleiras-Couto, M.M.; Hartog, B.J.; Huis in't Veld, J.H.J.; Hofstra, H.; van der Vossen, J.M.B.M. (1997) Identification of spoilage yeasts in a food production chain by microsatellite PCR fingerprinting. *Food Microbiol.* **13**, 59-67.

Baleiras-Couto, M.M.; Huis in't Veld, J.H.J. (1995) Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 327-334.

Baleiras-Couto, M.M.; van der Vossen, J.M.B.M.; Hofstra, H.; Huis in't Veld, J.H.J. (1994) RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 249-260.

Barberio, C.; Fani, R.; Raso, A.; Carli, A.; Polsinelli, M. (1994) DNA fingerprinting of yeast strains by restriction enzyme analysis. *Res. Microbiol.* **145**, 659-666.

Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. (1990) *Yeasts. Characteristics and Identification*. 2^a ed., Cambridge University Press, Cambridge.

Belloch, C.; Barrio, E.; García, M.D.; Querol, A. (1998) Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *System. Appl. Microbiol.* **21**, 266-273.

Bermejo, J.M. (1989) *Alteraciones fisicoquímicas y microbiológicas de los zumos de frutas durante su proceso de extracción y concentración*. Tesis Doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad del País Vasco.

Bills, S.; Restaino, L.; Lenovich, L.M. (1982) Growth response of an osmotolerant sorbate-resistant yeast, *Saccharomyces rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. J. Food Prot. **45**, 1120-1125.

Blaschke-Hellmessen, R.; Teuschel, G. (1970) *Saccharomyces rouxii* Boutroux als Ursache von Gaerungserscheinungen in geformten Marzipan- und Persipanartikeln und deren Verhuetung im Herstellerbetrieb (Fermentation cracking of shaped marzipan and marzipan substitute products caused by *Saccharomyces rouxii* Boutroux and its prevention). Nahrung **14**, 249-267.

Botha, A.; Kock, J.L.F. (1993) Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. Int. J. Food Microbiol. **19**, 39-51.

British Standards Institution (1940) British standard methods for the microbiological examination of butter. B.S. n° 895-1940, HMSO, Londres.

Brown, A.D.; Simpson, J.R. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular poliols. J. Gen. Microbiol. **72**, 589-591.

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. Arch. Microbiol. **159**, 220-224.

Cai, J.; Roberts, I.N.; Collins, M.D. (1996) Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-unit rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. **46** (2), 542-549.

Calvo, M. (1991) Aditivos Alimentarios. Propiedades, aplicaciones y efectos sobre la salud. Mira S.A. editores, Zaragoza.

Casas, E.; Garrido, M.P.; Quintana, M.A. (1996) Spoilage of marzipan products by an osmotolerant yeast. Adv. Food Sci. (CMTL) **18** (1/2), 56-60.

Codón, A.C.; Gasent-Ramírez, J.M.; Benítez, T. (1995) Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (2), 630-638.

Cole, M.B.; Keenan, M.H.J. (1987) Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii*, and its implications in weak-acid resistance. *Yeast* **3**, 23-32.

Cruickshank, R.H. (1983) Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **80**, 117-119.

Cheng, L.; Piper, P.W. (1994) Weak acid preservatives block the heatshock response and heat-shock-element-directed *lacZ* expression of low pH *Saccharomyces cerevisiae* cultures, an inhibitory action partially relieved by respiratory deficiency. *Microbiology* **140** (5), 1085-1096.

Davenport, R.R. (1981) Yeast and yeast-like organisms. En Onions, H.S., Allsopp, D., Eggins, H.O.W. (eds.), *Smith's Introduction to Industrial Mycology*, 7ª ed., Edward Arnold, Londres, pags. 65-83.

Davenport, R.R. (1980) *A Course Manual for Yeasts and Yeast-like Organisms*. Organizado por Conafrut/Ministerio de Comercio/Universidad de la Ciudad de México/ODA, Londres.

Deak, T.; Beuchat, L.R. (1996) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Deak, T.; Novak, E.K. (1972) Assimilation of sorbic acid by yeasts. *Acta Alimentaria*, **1** (1), 87-104.

Deak, T.; Reichart, O.; Szakmar, K.; Peter, G. (1992) Spoilage yeasts of unusual sorbate resistance. En Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.T., King, A.D. (eds.), *Developments in Food Science Modern Methods in Food Mycology*, Elsevier, Amsterdam, pags. 55-59.

Eklund, T. (1980) Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* **48** (3), 423-432.

Eklund, T. (1983) The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.* **54** (3), 383-389.

Eklund, T. (1985) The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the protonmotive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Gen. Microbiol.* **131** (1), 73-76.

El Halouat, A.; Debevere, J.M. (1996) Influence of modified atmosphere and preservatives on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from dried fruits. *Int. J. Food Microbiol.* **33** (2-3), 219-229.

El Halouat, A.; Debevere, J.M. (1997) Molds and yeasts isolated from hydrated prunes and raisins having different water activities. *Sci. Aliments* **17** (5), 539-545.

Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. System. Bacteriol.* **49**, 329-337.

Finol, M.L.; Marth, E.H.; Lindsay, R.C. (1982) Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. *J. Food Prot.* **45**, 398-404.

Fleet, G. (1992) Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotech.* **12**, 1-44.

Fowell, R.R. (1952) Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. *Nature* **170**, 578.

Freese, E.B.; Chu, M.I.; Freese, E. (1982) Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J. Bacteriol.* **149**, 840-851.

Golden, D.A.; Beuchat, L.R. (1990) Colony formation by sublethally heat-injured *Zygosaccharomyces rouxii* as affected by solutes in the recovery medium and procedure for sterilizing medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (8), 2319-2326.

Golden, D.A.; Beuchat, L.R. (1992a) Effects of potassium sorbate on growth patterns, morphology, and heat resistance of *Zygosaccharomyces rouxii* at reduced water activity. *Can. J. Microbiol.* **38** (12), 1252-1259.

Golden, D.A.; Beuchat, L.R. (1992b) Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Appl. Bacteriol.* **73** (6), 524-530.

Heard, G.M.; Fleet, G.H. (1990) A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 447-451.

Hocking, A.D. (1993) Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. En Jennings, D.H. (ed.), *Stress Tolerance of Fungi*, Marcel Dekker, Nueva York, pags. 248-249.

Holyoak, C.D.; Stratford, M.; McMullin, Z.; Cole, M.B.; Crimmins, K.; Brown, A.J.P.; 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (9), 3158-3164.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1991) *El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos*. Acribia, Zaragoza.

James, S.A.; Collins, M.D.; Roberts, I.N. (1994) Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast* **10**, 871-881.

James, S.A.; Collins, M.D.; Roberts, I.N. (1996) Use of an rRNA internal transcribed

spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46** (1), 189-194.

Jermini, M.F.G.; Geiges, O.; Schmidt-Lorenz, W. (1987) Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J. Food Prot.* **50** (6), 468-472.

Kinderlerer, J.L.; Hatton, P.V. (1990) Fungal metabolites of sorbic acid. *Food additives and contaminants* **7** (5), 657-669.

Kleyn, J.G. (1954) A study of some environmental factors controlling sporulation of yeast using a new sporulation medium. *Wallerstein Laboratories Communications* **17**, 91-104.

Klich, M.A.; Pitt, J.I. (1988) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, North Ryde, Australia.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984) *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 3^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984) Genus 7. *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij nom. cos. En Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 3^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 130-145.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1987) Classification of yeasts. En Rose, A.H. y Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, vol.1, *Biology of Yeasts*, 2^a ed., Academic Press, Londres, pags. 5-61.

Kurtzman, C.P. (1994) Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* **10**, 1727-1740.

Kurtzman, C.P. (1998) Nuclear DNA hybridation: quantitation of close genetic relationships. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 63-68.

Kurtzman, C.P.; Blanz, P.A. (1998) Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4ª ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 69-74.

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (1998) *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4ª ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. (1995) *Principios de Bioquímica*, 2ª ed., Ediciones Omega S.A., Barcelona, pags. 256, 669, 681.

Liewen, M.B.; Marth, E.H. (1985a) Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: a review. *J. Food Prot.* **48**, 364-375.

Liewen, M.B.; Marth, E.H. (1985b) Use of gas chromatography and mass spectroscopy to identify and determine 1,3-pentadiene in cheese or mold cultures. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180**, 45-47.

Lodder, J. (1970) *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 2nd edn., North Holland Publishing Company, Amsterdam.

Lueck, E. (1990) Food applications of sorbic acid and its salts. *Food additives and contaminants* **7** (5), 711-715.

Malfeito-Ferreira, M.; St. Aubyn, A.; Loureiro, V. (1989) The long-chain fatty acid composition as a tool for differentiating spoilage wine yeasts. *Mycotaxon.* **36**, 35-42.

Malfeito Ferreira, M.; Loureiro-Dias, M.C.; Loureiro, V. (1997a) Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 145-153.

Malfeito Ferreira, M.; Tareco, M.; Loureiro, V. (1997b) Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contaminations in wine bottling plants. *Int. J. Food Microbiol.*

38 (2-3), 143-155.

Marth, E.H.; Capp, C.M.; Hasenzahl, L.; Jackson, H.W.; Hussong, R.V. (1966) Degradation of potassium sorbate by *Penicillium* species. J. Dairy Science **49** (10), 1197-1205.

McClary, D.O.; Nulty, W.L.; Miller, G.R. (1959) Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. J. Bact. **78**, 362-368.

Miller, J.J. (1989) Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. En Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds.), The Yeasts, vol.3, Metabolism and Physiology of Yeasts, 2^a ed., Academic Press, Londres, pags. 489-550.

Montaño, A.; Sánchez, A.H.; Rejano, L. (1995) Determination of benzoic and sorbic acids in packaged vegetable products. Comparative evaluation of methods. Analyst **120**, 2483-2487.

Moreira da Silva, M.; Malfeito-Ferreira, M.; St. Aubyn, A.; Loureiro, V. (1994) Long-chain fatty acid composition as a criterion for yeast distinction in the brewing industry. J. Inst. Brew., **100**, 17-22.

Myers, D.K.; Lawlor, D.T.M.; Attfield, P.V. (1997) Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *S. cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. **63** (1), 145-150.

Neves, L.; Pampulha, M.E.; Loureiro-Dias, M.C. (1994) Resistance of food spoilage yeasts to sorbic acid. Lett. Appl. Microbiol. **19** (1), 8-11.

Noronha-da Costa, P.; Rodrigues, C.; Spencer-Martins, I.; Loureiro, V. (1996) Fatty acid patterns of film-forming yeasts and new evidence for the heterogeneity of *Pichia membranaefaciens*. Lett. Appl. Microbiol. **23**, 79-84.

Olliver, M. (1962) Problems in preservation by the use of sugar. En Hawthorne, J., Leitch,

J.M. (eds.), Recent Advances in Food Science, Butterworth, Londres, pags. 265-271.

Onishi, H. (1963) Osmophilic yeasts. *Adv. Food Res.* **12**, 53-94.

Oosthuizen, A.; Kock, J.L.F.; Botes, P.J.; Lategan, P.M. (1987) The long-chain fatty acid composition of yeasts used in the brewing industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 26-55.

Peña, A.; Sandra, P. (1995) Chemotaxonomic characterization of yeast cells. *J. Chromatogr. Sci.* **33**, 116-122.

Phaff, H.J. (1998) Chemotaxonomy based on the polysaccharide composition of cell walls and capsules. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4ª ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 45-47.

Piper, P.W.; Braley, R.; Calderón, C.O.; Kong, T.; Seymour, I.; Talreja, K. (1995) Adaptation of yeasts to weak organic acids; a specific stress response. *Yeast* **11**, S 585.

Pitt, J.I. (1991) A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, North Ryde, Australia.

Poncet, S.; Montrocher, R.; Couble, A. (1992) Electrophoretic isoenzyme patterns of some yeasts used in wine industry. *Cryptogamie, Mycol.* **13**, 283-286.

Praphailong, W.; Fleet, G.H. (1997) The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* **14** (5), 459-468.

Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T.; Ramón, D. (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (9), 2948-2953.

Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. (1992b) A comparative study of different methods of

yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.* **15**, 439-446.

Querol, A.; Huerta, T. Barrio, E.; Ramón, D. (1992c) Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *J. Food Sci.* **57** (1), 183-185, 216.

Ramírez, C. (1982) *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Ranken, M.D. (1993) *Manual de Industrias de los Alimentos*. 2ª ed., Acribia, Zaragoza.

Restaino, L.; Bills, S.; Tscherneff, K.; Lenovich, L.M. (1983) Growth characteristics of *Saccharomyces rouxii* isolated from chocolate syrup. *Appl. Environ. Microbiol.* **45** (5), 1614-1621.

Restaino, L.; Lenovich, L.M.; Bills, S. (1982) Effect on acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Prot.* **45** (12), 1138-1142.

Roeijmans, H.J.; Prillinger, H.; Umile, C.; Sugiyama, J.; Nakase, T.; Boekhout, T. (1998) Analysis of carbohydrate composition of cell walls and extracellular carbohydrates. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4ª ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 103-105.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** (5), 1020-1027.

Seiler, D.A.L. (1977) Fermentation problems in high sugar coatings and fillings. *Baking Industries Journal*, **9** (7), 4-6 y 8-10.

Skirdal, I.M.; Eklund, T. (1993). Microculture model studies on the effect of sorbic acid on *Penicillium chrisogenum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Ulocladium atrum* at

different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.* **74** (2), 191-195.

Sofos, J.N. (1989) *Sorbate Food Preservatives*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Sofos, J.N.; Busta, F.F. (1993) Sorbic acid and sorbates. En Davidson, P.M., Branen, A.L. (eds.), *Antimicrobials in Foods*, 2nd edn., Marcel Dekker, Nueva York, pags. 49-94.

Sousa-Dias, S.; Gonçalves, T.; Leyva, J.S.; Peinado, J.M.; Loureiro-Dias, M.C. (1996) Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology* **142** (7), 1733-1738.

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 Microbiol. Lett.* **142**, 53-58.

Suizu, T.; Tsutsumi, H.; Kawado, A. (1995) Analysis of lysine-dependent yeast sporulation: a decrease in cyclic AMP is not required for initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **141** (10), 2463-2469.

Taing ok; Hashinaga, F. (1997) Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43** (1), 39-47.

Tilbury, R.H. (1976) The microbial stability of intermediate moisture foods with respect to yeasts. En Davies, R., Birch, G.G., Parker, K.J. (eds.), *Intermediate Moisture Foods*, Applied Science, Londres, pags. 138-165.

Tokuoka, K.; Ishitani, T. (1991) Minimum water activities for the growth of yeasts isolated from high-sugar foods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**, 111-119.

Török, T.; Rockhold, D.; King, A.D. (1993) Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA-DNA hybridation in yeast identification. *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 63-80.

Tredoux, H.G.; Kock, J.L.F.; Lategan, P.M. (1987a) The use of cellular long-chain fatty acid composition in the identification of some yeasts associated with the wine industry. *System. Appl. Microbiol.* **9**, 299-306.

Tredoux, H.G.; Kock, J.L.F.; Lategan, P.M.; Muller, H.B. (1987b) A rapid identification technique to differentiate between *Saccharomyces cerevisiae* strains and other yeast species in the wine industry. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 161-164.

Tudor, E.A.; Board, R.G. (1993) Food-spoilage yeasts. En Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, vol.5, *Yeast Technology*, 2^a ed., Academic Press, Londres, pp. 435-516.

Vaughn, R.H.; Stevenson, K.E.; Dave, B.A.; Park, H.C. (1972) Fermenting yeasts associated with softening and gas-pocket formation in olives. *Appl. Microbiol.* **23** (2), 316-320.

Viñas, I.; Morlans, I.; Sanchís, V. (1990) Potential for the development of tolerance by *Aspergillus amstelodami*, *A. repens* and *A. ruber* after repeated exposure to potassium sorbate. *Zentralbl. Mikrobiol.* **145**, 187-183.

van der Vossen, J.M.B.M.; Hofstra, H. (1996) DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 35-49.

Wahdan, H.A.L. (1988) Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, **26** (1), 30-35.

van der Walt, J.P. (1987) The typological yeast species, and its delimitation. En Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, vol.1, *Biology of Yeasts*, 2^a ed., Academic Press, Londres, pags. 95-121.

van der Walt, J.P.; Yarrow, D. (1984) Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. En Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.), *The Yeasts. A Taxonomic*

Study, 3^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 45-104.

Warth, A.D. (1977) Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* **43** (2), 215-230.

Warth, A.D. (1988) Effects of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (8), 2091-2095.

Warth, A.D. (1989) Relationships among cell size, membrane permeability, and preservative resistance in yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (11), 2995-2999.

Warth, A.D. (1991a) Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects on glycolytic metabolite levels, energy production, and intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (12), 3410-3414.

Warth, A.D. (1991b) Effect of benzoic acid on glycolytic metabolite levels and intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (12), 3415-3417.

Wheals, A.E. (1987) Biology of the cell cycle in yeasts. En Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, vol.1, *Biology of Yeasts*, 2^a ed., Academic Press, Londres, pags. 283-390.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J (eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, California, pags. 315-322.

Wickerham, L.J.; Flickinger, M.H.; Burton, K.A. (1946) A modification of Henrici's vegetable-juice sporulation medium for yeasts. *J. Bact.* **52**, 611-612.

Wickerham, L.J. (1951) *Taxonomy of Yeasts*. Technical Bulletin No. 1029, United States Department of Agriculture.

- Wind, C.E.; Restaino, L. (1995) Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *J. Food Prot.* **58** (11), 1257-1259.
- Windisch, S. (1969) Osmotolerante Hefen (Osmotolerant yeasts). *Gordian*, **69** (1625), 115-119.
- Windisch, S.; Kowalski, S.; Zander, I. (1978a) Demonstration of osmotolerant yeasts in almonds. *CCB Review for Chocolate, Confectionery and Bakery* **3**, 28-29.
- Windisch, S.; Kowalski, S.; Zander, I. (1978b) Nachweis von osmotoleranten Hefen in Mandeln (Detection of osmotolerant yeasts in almonds). *Zucker und Süßwarenwirtschaft*, **31** (5), 177 y 179-180.
- Yamada, Y. (1998) Identification of coenzyme Q (ubiquinone) homologs. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W., *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 101-102.
- Yamakazi, M.; Kurtzman, C.P.; Sugiyama, J. (1998) Electrophoretic comparisons of enzymes. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W., *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 49-53.
- Yarrow, D. (1984) Genus 22. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. En Kreger-van Rij, N.J.W., *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 3^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 393-395.
- Yarrow, D. (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W., *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4^a ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pags. 77-100.
- Zimmerly, A. (1980) Quantitative Bestimmung von wenigen osmotoleranten Hefen in Lebensmitteln (Quantitative determination of small numbers of osmotolerant yeasts in foods). *Alimenta*, **19** (3), 67-71.

VIII.- APÉNDICES

APÉNDICE I.- MEDIOS DE CULTIVO

Medios generales para el aislamiento y crecimiento de microorganismos

PDA (Potato Dextrose Agar)

Deshidratado (Difco).

TSA (Tryptone Soy Agar)

Deshidratado (Oxoid).

YMA (Yeast Morphology Agar) (g/L)

glucosa	10,0
peptona proteosa (Difco)	5,0
extracto de levadura (Difco)	3,0
extracto de malta (Difco)	3,0
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

YMB (Yeast Morphology Broth) con 330 g/L de glucosa (g/L)

glucosa	330,0
peptona proteosa	5,0
extracto de levadura	3,0
extracto de malta	3,0

Esterilizar a 115°C, 10'

(Golden y Beuchat, 1990, 1992b).

Medios empleados para la identificación de levaduras

Agar urea de Christensen (g/L)

glucosa	1,0
peptona proteosa	1,0
NaCl	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
rojo fenol (indicador)	0,012
agar	20,0
agua destilada	900,0 mL

Tras autoclavar (121°C, 20'),
añadir 20 mL de una solución de urea
al 20% esterilizada por filtración.

Corn Meal Agar

Deshidratado (Difco).

Crecimiento en 50% (p/p) de glucosa

extracto de levadura	10,0 g	
glucosa	500,0 g	Esterilizar a 115°C, 10'.
agar	20,0 g	
agua destilada	500 mL	

Crecimiento en 60% (p/p) de glucosa

extracto de levadura	10,0 g	
glucosa	600,0 g	Esterilizar a 115°C, 10'.
agar	20,0 g	
agua destilada	400 mL	

Hidrólisis de arbutina (g/L)

extracto de levadura	1,0	Tras autoclavar (121°C,
arbutina	5,0	20'), añadir 10 mL de solución
agar	20,0	de citrato férrico-amónico al 1%.

Medio base para fermentación (g/L)

extracto de levadura	4,5	Esterilizar a 121°C, 20'.
peptona proteosa	7,5	
azul de bromotimol (indicador) a saturación		

Tolerancia a la cicloheximida (g/L)

YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) (Difco)	67,0	Esterilizar por filtración.
glucosa	100,0	
cicloheximida	0,1 (0,01%) ó 1 (0,1%)	

Vitamin-free medium (g/L)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄	0,5
NaCl	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
Bacto dextrosa	10,0
L-histidina	0,01
DL-metionina	0,02
DL-triptófano	0,02

Esterilizar por filtración.

Añadir 1 mL de las soluciones A y B de oligoelementos, estériles por filtración:

Solución oligo A (g/L)

H ₃ BO ₃	10,0
KI	2,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4,0

Solución oligo B (g/L)

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,4
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,8

Ajustar a pH 3,0 con ClH.

Medios de esporulación

Agar acetato según Fowell (g/L)

acetato sódico anhidro	4,0
agar	15,0

Ajustar a pH 6,5-7,0.

Esterilizar a 121°C, 20'.

Agar acetato según Kleyn (g/L)

acetato sódico anhidro	5,0
glucosa	0,62
NaCl	0,62
peptona proteosa	2,5
agar	15,0

Ajustar a pH 6,9-7,1.

Esterilizar a 121°C, 20'.

Agar acetato según McClary (g/L)

acetato potásico	9,8
glucosa	1,0
NaCl	1,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
extracto de levadura	2,5
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

Corn Meal Agar

Ver apartado de medios empleados para la identificación de levaduras.

EMB (eosina-azul de metileno)

Deshidratado (Oxoid).

Extracto de malta (g/L)

extracto de malta	40,0
agar	24,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

Agar Gorodkova (g/L)

glucosa	1,0
peptona	10,0
NaCl	5,0
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

MAc (Manitol-ácido acético) (g/L)

manitol	10,0
extracto de levadura	10,0
agar	20,0

Tras autoclavar (121°C, 20'), añadir 5,0 mL de ácido acético.

PDA

Ver apartado de medios generales.

PRE-1 (g/L)

glucosa	10,0
extracto de levadura	10,0
peptona	10,0
agar	20,0

PRE-2 (g/L)

glucosa	100,0
extracto de levadura	8,0
peptona	3,0
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

SPO-1 (g/L)

acetato potásico	10,0
extracto de levadura	1,0
glucosa	0,5
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

SPO-2 (g/L)

acetato potásico	5,0
extracto de levadura	1,0
glucosa	0,5
agar	20,0

V8 (8 vegetales)

levadura de panadería	7,1 g
agar	20,0 g
sopa Campbell 8 vegetales	500,0 mL
agua destilada	500,0 mL

Esterilizar a 121°C, 20'.

V8 diluido 1/10

levadura de panadería	0,71
agar	20,0
sopa Campbell 8 vegetales	50,0 mL
agua destilada	950 mL

YEGP (extracto de levadura-glucosa-peptona) (g/L)

extracto de levadura	5,0
glucosa	20,0
peptona	10,0
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

YMA

Ver apartado de medios generales.

YMA 2% NaCl

NaCl	20,0 g
YMA	1000 mL

Esterilizar a 121°C, 20'.

Los medios que no se adquirieron deshidratados se prepararon en líquido, y en sólido, agregando un 2% de agar.

Medios para la identificación de hongos filamentosos

Concentrado de Czapek (g/L)

NaNO ₃	300,0
KCl	50,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0,5

No necesita esterilización.

Czapek-Yeast extract Agar (CYA) (g/L)

K ₂ HPO ₄	1,0
concentrado de Czapek	10 mL
extracto de levadura	5,0
sacarosa	30,0
agar	15,0

CYA 20% (p/v) sacarosa (CY20S) (g/L)

K ₂ HPO ₄	1,0
concentrado de Czapek	10 mL
extracto de levadura	5,0
sacarosa	200,0
agar	15,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

Agar nitrato glicerol al 25% (G25N) (g/L)

K ₂ HPO ₄	0,75
concentrado de Czapek	7,5 mL
extracto de levadura	3,7
glicerol (para análisis)	250,0
agar	12,0
H ₂ O	750 mL

Agar extracto de malta (MEA) (g/L)

extracto de malta	20,0
peptona	1,0
glucosa	20,0
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

Medios para la reproducción de las alteraciones

Medio base para la reproducción del olor a "petróleo"

Caldo Nutritivo nº 2 (Oxoid)	500 mL	
azúcar refinado	500 g	Esterilizar a 115°C, 10'.

A este medio base se le añaden las concentraciones de sorbato potásico especificadas en los correspondientes apartados, ajustando el pH si es necesario.

<u>66% (p/p) sacarosa + 34% (p/p) almendra</u>		<u>1% (p/p) sacarosa + 99% (p/p) almendra</u>	
azúcar refinado	66,0 g	azúcar refinado	1,0 g
almendra pulverizada	34,0 g	almendra pulverizada	99,0 g
extracto de levadura	1,0 g	extracto de levadura	1,0 g
Esterilizar a 115°C, 10'.			

660 g/L sacarosa + 5 g/L almendra

azúcar refinado	66,0 g	
almendra pulverizada	0,5 g	Enrasar a 100,0 mL.
extracto de levadura	0,5 g	Esterilizar a 115°C, 10'.
agar	1,5 g	

660 g/L sacarosa + indicadores

sacarosa	660,0 g	
extracto de levadura	10,0 g	Esterilizar a 115°C, 10'.
agar	15,0 g	
agua destilada	340,0 mL	

Concentración de los indicadores: 0,01% para azul de bromofenol, rojo Congo y verde de bromocresol, que se incorporan en el medio antes de autoclavarlo. El rojo de metilo, que es insoluble en agua, se añade a los cultivos tras la incubación en forma de solución:

rojo de metilo	0,05 g
etanol de 96°	10 mL
agua destilada	100 mL

Chalk Agar (g/L)

glucosa	50,0
extracto de levadura	10,0
CaCO ₃	5,0
agar	20,0

Esterilizar a 121°C, 20'.

Medio Gorodkova para lipolisis (g/L)

glucosa	1,0
peptona	10,0
NaCl	5,0
agar	15,0
agua destilada	950,0 mL

Una vez autoclavado (121°C, 20'),
añadir 50 mL de aceite de almendras y agitar
hasta conseguir una emulsión homogénea.

Revelado: añadir una solución saturada de SO₄Cu, estéril por filtración, manteniendo 15 minutos sobre la placa.

Agar de Frazier (agar caseinato cálcico)

Deshidratado (Merck).

Para este trabajo, se añadieron 0,5 g/L de glucosa. Si no se observan halos de proteolisis, se puede cubrir la placa con una solución de ácido acético al 2%, que precipita la caseína no hidrolizada.

Base de agar tributirina

Deshidratada (Oxoid).

Para 990 mL de medio base, añadir 10 mL de tributirina o, para este trabajo, 10 mL de aceite de almendras. También se incorporaron 0,5 g/l de glucosa.

YMA + gelatina

YMA	1000,0 mL
gelatina	10 g

YMA + almidón

YMA	1000,0 mL
almidón	10 g

Esterilizar a 121°C, 20'.

Medio inductor de pectinasa (g/L)

NaOH	1,0
ácido málico	3,0
NH ₄ NO ₃	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
extracto de levadura	5,0
pectina de manzana	10,0
agar	15,0

Para este trabajo se añadieron 5 g/L de glucosa.

El pH del medio se ajustó a 6,0.

Esterilizar a 121°C, 20'.

Revelado: mediante una solución de bromuro de hexadecil trimetilamonio al 1% o, en su defecto, de ácido clorhídrico 1N.

APÉNDICE II.- DENOMINACIÓN ACTUAL DE LEVADURAS QUE APARECEN EN ALGUNAS REFERENCIAS Y HAN CAMBIADO DE NOMBRE

Denominación antigua	Denominación actual	Referencias
<i>Candida claussenii</i>	<i>Candida albicans</i>	Sofos, 1989
<i>Hansenula anomala</i> var. <i>anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>	Vaughn <i>et al.</i> , 1972 Tilbury, 1976
<i>Octosporomyces octosporus</i>	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Barnett <i>et al.</i> , 1990
<i>Procandida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Sofos, 1989
<i>Procandida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Sofos, 1989
<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Restaino <i>et al.</i> , 1982 Sofos, 1989
<i>Saccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Tilbury, 1976 Warth, 1977 Bills <i>et al.</i> , 1982 Restaino <i>et al.</i> , 1982 Restaino <i>et al.</i> , 1983 Sofos, 1989
<i>Saccharomyces bailii</i> var. <i>osmophilus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Tilbury, 1976 Seiler, 1977 Restaino <i>et al.</i> , 1982 Sofos, 1989
<i>Saccharomyces bisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Seiler, 1977 Restaino <i>et al.</i> , 1982
<i>Saccharomyces bisporus</i> var. <i>mellis</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Tilbury, 1976
<i>Saccharomyces mellis</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Seiler, 1977
<i>Saccharomyces oleaginosus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vaughn <i>et al.</i> , 1972
<i>Saccharomyces rouxii</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Windisch, 1969 Brown y Simpson, 1972 Tilbury, 1976 Seiler, 1977 Bills <i>et al.</i> , 1982 Restaino <i>et al.</i> , 1982 Restaino <i>et al.</i> , 1983 Sofos, 1989
<i>Saccharomyces rouxii</i> Boutroux	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Blaschke-Hellmessen y Teuschel, 1970
<i>Torulopsis apicola</i>	<i>Candida apicola</i>	Tilbury, 1976
<i>Torulopsis bacillaris</i>	<i>Candida apicola</i>	Tilbury, 1980
<i>Torulopsis candida</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Tilbury, 1976 Tilbury, 1980
<i>Torulopsis lactis-condensi</i>	<i>Candida lactis-condensi</i>	Tilbury, 1976

