



UTILIZACIÓN DEL ANÁLISIS HIPERESPECTRAL COMO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LEVADURAS EN ALIMENTOS DETERIORADOS

Gil, Elena ¹; Rivas, Eva M^a ¹

Tutores: de Silóniz, María Isabel ¹; Lleó, Lourdes ²

¹Dpto. de Microbiología III. Fac. de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. CEI-Moncloa.

²Dpto. de Ciencia y Tecnología Aplicadas a la Ingeniería Técnica Agrícola. E.T.S.I. Agrónomos.

Universidad Politécnica de Madrid. CEI-Moncloa.

Correo electrónico: egildeprado@gmail.com

RESUMEN

La microbiología predictiva desarrolla modelos matemáticos que describen el comportamiento microbiano en alimentos. Su eficiencia es limitada en alimentos con algún grado de estructura, que son la mayoría, porque estos modelos están basados en datos experimentales obtenidos en cultivos líquidos, mucho más homogéneos. En este trabajo se evalúa la técnica de análisis hiperespectral como una nueva tecnología para la detección precoz de levaduras en alimentos sólidos mediante análisis de componentes principales. Las imágenes hiperespectrales (400-1000 nm) de placas de Petri inoculadas con *Zygosaccharomyces rouxii* Bch a diferentes tiempos, muestran que el primer componente discrimina entre el agar y las colonias, mientras que el segundo revela una mayor variabilidad en las colonias. Esta herramienta no invasiva caracteriza el estado de desarrollo, número y tamaño de las colonias, por lo que permitiría obtener datos para elaborar modelos más fiables para predecir el riesgo de deterioro y la vida útil de los alimentos.

Palabras clave: *análisis hiperespectral, levadura, alimentos sólidos*

INTRODUCCION

La microbiología predictiva, a través de los modelos matemáticos del comportamiento microbiano en alimentos, es una herramienta fundamental en la mejora de la calidad y seguridad de los mismos. Las levaduras son agentes reconocidos de deterioro en alimentos (Deak, 2007) que cada vez son más relevantes en los alimentos sólidos. En los últimos años, se ha incrementado la demanda de vegetales, frutas y en general alimentos mínimamente procesados y preparados para el consumo, destacando su frescura y comodidad de uso. Estos alimentos presentan un mayor riesgo de deterioro microbiano, debido principalmente a que no han sido sometidos a procesos que disminuyan su carga microbiana y además, suelen estar confinados en envases pequeños. La acidez, el uso de atmósferas modificadas, y otros factores favorecen el crecimiento de las levaduras, convirtiéndose en agentes alterantes frecuentes y a veces dominantes en este tipo de alimentos (Jacxsens et al., 2002; Tournas et al., 2006).

La estructura interna del alimento es un factor clave en el comportamiento de los microorganismos contaminantes (Hills et al., 2001). Sin embargo, las metodologías actuales de detección de microorganismos en alimentos sólidos, son destructivas. Por ello, se establece el análisis hiperespectral como una nueva técnica para detectar los cambios que se producen en los alimentos debido a la contaminación por levaduras, ya que aparecen ligados a variaciones medidas a longitudes de onda en el rango del visible y el infrarrojo cercano. Esta técnica ya ha sido aplicada con anterioridad, para detectar contaminación en vegetales por bacterias y hongos (Liu et al., 2007; Delwiche et al., 2011; Silva et al., 2011).



Este estudio ha sido realizado con *Zygosaccharomyces rouxii* Bch, una de las principales especies de levaduras deteriorante de alimentos y bebidas. Esta levadura se encuentra aislada de alimentos de actividad de agua intermedia, como jarabes concentrados, zumos de fruta, mazapán y miel, entre otros. La adición de conservantes a algunos alimentos puede provocar su deterioro, debido a la transformación de sorbato en 1-3-pentadieno por determinadas especies microbianas. Este es el caso de la capacidad de algunas cepas de mohos y levaduras que son capaces de decarboxilar el ácido sórbico transformándolo en 1-3 pentadieno, un compuesto volátil con un olor desagradable a petróleo (Casas, 1999).

El objetivo de este trabajo es establecer modelos fiables que permitan la detección de levaduras en alimentos sólidos, prediciendo el riesgo de deterioro y la vida útil de los alimentos, al utilizar una nueva técnica: el análisis hiperespectral. La presente investigación propone una aplicación preliminar de procesamiento de imágenes hiperespectrales para la detección de la presencia de levaduras en medio orgánico (agar).

MATERIAL Y MÉTODOS

CONDICIONES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Zygosaccharomyces rouxii Bch, es una cepa de levadura aislada de un alimento deteriorado, en nuestro laboratorio, y mantenida rutinariamente en tubos de YMA (*Yeast Morphology Agar*) a 28° C.

Esta cepa se inoculó, a partir de un cultivo fresco de 48 h, en matraces de 250 ml de capacidad que contenían 100 ml de medio YMB (*Yeast Morphology Broth*). Tras su incubación en agitación durante 18 h a 28°C, se midió su densidad óptica a 620 nm y se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonia/ml por interpolación en una recta patrón. Se procedió a la realización de diluciones decimales en suero salino (9 g/l de NaCl, Panreac Química, Barcelona, España) y a la inoculación de gotas de 50 µl de la dilución apropiada, en la que se preveía que se obtendría una única UFC, en regiones rotuladas de 4 cm² de placas de Petri (85 mm Ø) con 15 ml de YMA (10g/l de glucosa), con el fin de tomar la imagen hiperespectral de esa región antes de que el crecimiento fuera visible (Figura 1).

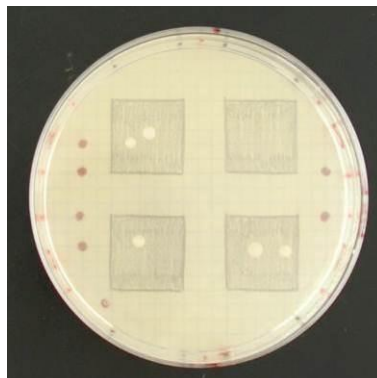
ANÁLISIS HIPERESPECTRAL

Tres placas de Petri con medio de cultivo agar fueron inoculadas con las levaduras. Las imágenes hiperespectrales fueron adquiridas a lo largo del tiempo, justo tras la inoculación y después de uno, dos, tres y seis días. El sistema de visión hiperespectral consistía en un detector CCD lineal tipo push-broom acoplado a un espectrógrafo Headwall Photonics VNIR (400 a 1000 nm, resolución espectral 3 nm, tiempo de adquisición de 275 ms).

Una vez adquiridas las imágenes hiperespectrales, se procedió a su análisis. Para ello, en primer lugar, se constituyó un set de calibración de espectros representativos del medio de cultivo, el agar, y de la levadura pertenecientes a los distintos días de ensayo, n=200 espectros. Dicho set fue sometido a un análisis de componentes principales. Como resultado del mismo, se obtuvieron las variables latentes que se emplearon en la posterior proyección del conjunto de espectros de calibración y de las imágenes hiperespectrales.



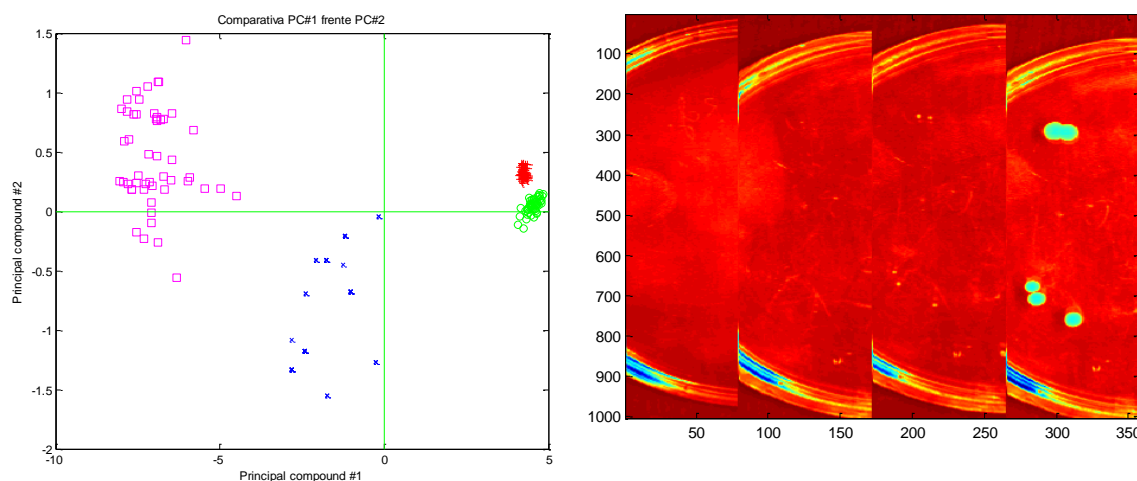
Figura 1. Disposición de las placas de Petri para la adquisición de las imágenes hiperespectrales. La inoculación se realizó en la zona correspondiente de los cuadrados.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros se proyectaron sobre el plano constituido por los dos primeros componentes principales (figura 2, izquierda). Se muestran claras diferencias entre los espectros de agar y los espectros de levaduras. El primer componente separa completamente el agar y las levaduras, mientras que el segundo componente permite distinguir entre las distintas condiciones del agar, probablemente debido a una posible diferencia en el grado de hidratación del mismo. En cuanto a los scores de levaduras, aparecen muy dispersos en el plano, posiblemente porque hay zonas de la colonia que presentan células con distinto grado de desarrollo o actividad. Este análisis también ha sido aplicado por Wang *et al.*, (2012) para detectar zonas infectadas en cebolla mediante imágenes hiperespectrales. Por otra parte, la variabilidad correspondiente al agar es muy inferior a la levadura, por lo tanto, el agar para cada día considerado, se muestra más homogéneo que la levadura. En cuanto a las imágenes resultantes de la proyección sobre el primer componente principal, imágenes de scores, se puede observar que el tamaño de las colonias va incrementándose con el tiempo. Por tanto, dichas imágenes pueden permitir cuantificar la evolución del tamaño de las colonias (figura 2, derecha).

Figura 2. Izquierda, PC1 and PC2 scores del agar (+, o) y levaduras (□, x) (n=200 espectros). Derecha, imágenes de scores obtenidos de la proyección de las imágenes hiperespectrales sobre el primer componente principal. De izquierda a derecha, recién inoculado, después de uno, dos, tres y seis días).





CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra los resultados preliminares de la aplicación de las imágenes hiperespectrales para la detección del desarrollo de colonias de levaduras de la cepa *Zygosaccharomyces rouxii* Bch. Se muestra que es posible detectar el desarrollo de colonias sobre el medio de cultivo agar.

Las imágenes de scores del agar y levaduras correspondientes a un Análisis de Componentes Principales muestran el potencial de la espectroscopía y su visión como herramientas para la detección no destructiva del desarrollo de levaduras. Se necesitan hacer más experimentos para confirmar dicho resultado, aumentando el tamaño muestral, donde se mejore la resolución espacial, y se obtengan imágenes más detalladas que permitan identificar distintas áreas de desarrollo de la colonia. Además, se puede proponer una selección de longitudes de onda relacionadas con el desarrollo de las colonias, con el fin de proponer un futuro sistema de visión multiespectral (Roger, 2011).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido realizada gracias a la financiación de los proyectos GR35/10A (Santander-Central Hispano-UCM), MULTIHORT (AGL2008-05666-C02-01 del Plan Nacional de I+D del Ministerio de Ciencia e Innovación) y TAGRALIA (S0505/AGR-0187. Tecnologías 2005 de la Comunidad de Madrid) y la beca de investigación PICATA del Campus de Excelencia Internacional. Agradecimientos a José Martínez Peinado y María Isabel de Silóniz del grupo de Hongos y Levaduras de Interés en Agroalimentación (UCM) y a Lourdes Lleó y Pilar Barreiro del grupo LPF_Tagralia (UPM), por su colaboración y esfuerzo. Ambos grupos de investigación forman parte del CEI-Moncloa.

BIBLIOGRAFÍA

- Casas, E. 1999. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Deak, T. 2007. Handbook of spoilage yeasts. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton. FL. USA.
- Delwiche, S. R., Kim, M.S., Dong, Y. 2011. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety. 5: 63-71.
- Hills, B. P., Arnould, L., Bossu, C., Ridge, Y.P. 2001. Int. J. of Food Microbiol. 66(3): 163-173.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J. 2002. Int. J. of Food Microbiol. 73: 331-341.
- Liu, Y. L., Chen, Y.R., Kim, M.S., Chan, D.E., Lefcourt, A.M. 2007. J. of Food Engineering. 81: 412-418.
- Roger, J.M., Palagos, B., Bertrand, D., Fernández-Ahumada, E. 2011. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 106: 216-223.
- Silva, J.S., Castro, C.C., Vicente, A.A., Tafulo, P., Jorge, P.A.S., Martins, R.C. 2011. The International Society for Optical Engineering. Braga.
- Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L. 2006. Food Microbiol. 23: 684-688.
- Wang, W., Li, C., Tollner, E.W., Gitaitis, R.D., Rains, G.C. 2012. J. of Food Engineering. 109: 38-48.