

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE SISTEMAS RÁPIDOS
PARA LA DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS ALTERANTES DE
ALIMENTOS

PATRICIA MARTORELL GUEROLA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de
Febrer de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Juan José Córdoba Ramos
- D^a. María Isabel de Sioniz Jiménez
- D. Virgilio Borges Loureiro
- D. José María Guillamón Navarro
- D. Sergi Ferrer Soler

Va ser dirigida per:

D^a. Amparo Querol Simón

D^a. María Teresa Fernández-Espinar

©Copyright: Servei de Publicacions
Patricia Martorell Guerola

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6512-7

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología y Ecología



Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

Departamento de Biotecnología



Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos

Trabajo presentado por Dña. PATRICIA MARTORELL GUEROLA para optar al grado de doctor por la Universitat de Valencia.

Valencia, 2005



**MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA**



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

La Dra. Amparo Querol Simón, Investigador Científico del CSIC, Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos y la Dra. M^a Teresa Fernández-Espinar García, Científico Titular del CSIC en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, hacen constar que:

Patricia Martorell Guerola, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria, que lleva por título: “Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos”, para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas.

Burjassot, Diciembre 2005

Fdo. Dra. Amparo Querol Simón

Fdo. M^a Teresa Fernández-Espinar García

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de distintas ayudas:

- Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (2001-2005).

- Beca del Ministerio de Educación y Ciencia para la realización de estancias breves: Food Processed Group (Investigador principal: Dr. Malcolm Stratford), Unilever R&D, Bedford, U.K. (2004).

El trabajo aquí descrito se enmarca dentro del proyecto que lleva por título “Identificación rápida de levaduras y hongos filamentosos alterantes y modificadores de alimentos por métodos de biología molecular”, de la comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) AGL2000-1492.

A mis padres

Me llena de alegría y a la vez de un poco de nostalgia, el poder dirigirme a todos vosotros y tratar de expresar mi agradecimiento a todas las personas con las que he compartido tantas experiencias hasta llegar al final de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras Amparo Querol y Teresa Fernández-Espinar, que han hecho posible esta tesis doctoral. Ha sido un gusto poder formar parte de vuestro grupo de trabajo, no sólo a nivel profesional sino también personalmente. Gracias por vuestro apoyo, ánimo y buenos consejos, así como el optimismo que me habéis transmitido en tantas ocasiones, y que tan necesario es para los que estamos empezando.

A Loly y Federico, por vuestras enseñanzas y por darme la primera oportunidad.

A Eladio, gracias por haberme ayudado siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio Silvia, Mariana, Carmela, Patricia, Sara, Armando, Laura, M^a José y Roseta. Todas habéis hecho que mi trabajo en el laboratorio haya sido realmente agradable. No olvidaré los buenos momentos que hemos pasado juntas, que han sido muchos. A Silvia, mucha suerte en tu tesis, estoy segura que lo vas a hacer muy bien. A Mariana, ha sido muy gratificante tu compañía. A tí Carmela, gracias por ayudarme tanto, siempre lo has hecho. A Patricia, mi compi de "Light-cycler". Y a ti Sara, gracias por ser tan cariñosa, ya se te echa de menos. A M^a José, gracias por tus buenos consejos y por escucharme siempre que lo he necesitado. Y a mi querida compañera Roseta, gracias por hacerme reír y en general, por tu compañía durante tantos años. Gracias por tu amistad y mucha suerte en el futuro!

Quiero agradecer también a todas las personas que, en periodos cortos, han formado parte del grupo de trabajo, conocerles ha sido muy enriquecedor. Gracias a Bill, Rosiña, Clara, Noé, Teresa, André, Vicent, Lorena y Maite. A Christian, gracias por ser tan divertido y animar tanto el laboratorio con tus historias; y a Manolo, realmente me has ayudado mucho, gracias por esos momentos tan agradables y por nuestras conversaciones transcendentales!

A todas las personas que forman o han formado parte del departamento de Biotecnología, con las que he vivido cada día: Empar, Patricia, Bea, Juan, Edu, M^a Carmen, Benito, Begoña, Ester, Rosa, Ajo, Pepa, Daniel, Jose Vicente (gracias por tu ayuda y paciencia en temas de informática y estadística), Pedro, Marian, Paloma, Salvador, Vicky, Boro, Encarna, María, Jose María, Pedro, María, Marga, Adela, Andrew (gracias por venir a animar tanto el 307!) , Luisa (gràcies per els teus ànims) , Josep Vicent (gràcies per els teus "piropos"), Michelle, Óscar, Juanan, Pili (cuántos momentos buenos juntas eh!), Claudia, Fernando, Estefanía y todas las personas de los laboratorios a cargo de Antonio, Carmen, Jose Antonio, Marcel.Í, Paqui y Emilia. He disfrutado mucho compartiendo con todos vosotros tertulias, comidas, cenas, bailes, seminarios y congresos. A todos, gracias!

A todas aquellas personas que forman parte de distintos servicios o departamentos del IATA y que siempre me prestaron su ayuda desinteresada. Gracias a Fernando y Pedro por su ayuda con la informática, a Mariano por su simpatía y profesionalidad, a Pepe Carbonell, por su ayuda con las gráficas, a Amparo Fera y toda la gente de su laboratorio, que me ayudaron en temas de microbiología, a Carlos por tenerme al día con la bibliografía y a otros muchos que habéis hecho que mi trabajo resulte más fácil. Ah! Y gracias a Miguel, Pedro e Isa, por esos cafetitos tan buenos cada mañana.

A todos los compañeros de la Colección Española de Cultivos Tipo, con los que aprendí muchas cosas además de vivir momentos muy bonitos durante mi etapa como alumna colaboradora: gracias a M^a José, Laura, Juan, Chemi, Merche, Inma, Raquel, David y todas las personas que en este momento forman parte de ella.

A los diferentes grupos de trabajo del departamento de Microbiología con los que, de manera temporal, he estado vinculada. Gracias a Esperanza, M^a Jesús, Sergi e Isabel por haberme dado la oportunidad de aprender distintos aspectos de la microbiología, y que ha sido tan importante para mi formación como investigadora.

Quiero agradecer a Malcolm y Hazel su hospitalidad y la enorme ayuda que me prestaron durante mi estancia en su laboratorio. Gracias por hacerme sentir como en casa en momentos de enorme soledad. Gracias también a todas las personas que me cuidaron, tanto en el laboratorio como en mi casa de Inglaterra.

A mis amigos, gracias por quererme tal como soy.

Y por último a mi familia. A mis padres, por haber confiado siempre en mí, y a mis hermanos Juan y Marisa, por su apoyo constante y su sinceridad. Sin vuestra ayuda este trabajo no habría sido posible. Gracias también a Pedro, Merce, Pilar, Fernando y Marina, que ya son parte de mi familia.

Y a tí Paco, gracias por tu cariño y comprensión. Es una suerte poder vivir tantas cosas juntos, entre ellas este trabajo que puedes considerar también tuyo.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Las levaduras alterantes de alimentos	1
1.1. Concepto de alteración del alimento	2
1.2. Principales levaduras alterantes	2
1.3. Alimentos susceptibles a alteración	3
1.4. Efecto de las levaduras en la alteración de los alimentos	6
1.5. Niveles aceptables de levaduras en alimentos	7
1.6. Consecuencias económicas de la alteración por levaduras	8
1.7. Control de la alteración de alimentos: sistemas de conservación	8
1.7.1. Inhibición por conservantes químicos	9
1.7.2. Otros factores que constituyen sistemas de conservación del alimento	11
2. Técnicas de identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos	13
2.1. Métodos moleculares para la identificación de levaduras a nivel de especie	14
2.1.1. Métodos basados en el análisis de regiones ribosómicas	14
2.1.2. PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	16
2.1.3. PCR a tiempo real	17
2.1.4. Otras tecnologías	18
2.2. Métodos moleculares para la diferenciación a nivel de cepa	21
2.2.1. Electroforesis de cromosomas en campo pulsante	21
2.2.2. Análisis de restricción del DNA mitocondrial	22
2.2.3. Métodos basados en la técnica de PCR	23
3. Técnicas de cuantificación de levaduras alterantes de alimentos	28
3.1. Métodos convencionales de enumeración de levaduras (Recuento en placa)	29
3.1.1. Técnicas de pre-tratamiento	29
3.1.2. Medios de cultivo selectivos y diferenciales	29
3.2. Métodos rápidos de enumeración de levaduras	31
3.2.1. PCR a tiempo real	32
3.2.2. Otras técnicas rápidas de enumeración de levaduras	36
4. Aplicaciones	37
4.1. Estudio de la diversidad de levaduras en alimentos	37
4.2. Estudio del origen de contaminación en la cadena de producción alimentaria	40
4.3. Detección de levaduras alterantes en el alimento	42

Índice

4.4. Cuantificación de levaduras alterantes en el alimento	44
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Cepas microbianas	49
1.1. Cepas de levadura de colecciones de cultivo	49
1.2. Cepas de levadura aisladas de alimentos y bebidas	53
1.3. Cepas bacterianas de colecciones de cultivo	55
2. Medios de cultivo	55
2.1. Medios para el cultivo de levaduras	55
2.2. Medios para el cultivo de bacterias	56
3. Oligonucleótidos	57
4. Condiciones generales de cultivo de microorganismos	59
4.1. Cultivo de levaduras	59
4.2. Cultivo de bacterias	59
4.3. Enriquecimiento de levaduras a partir de cultivos en GPY y muestras de vino contaminado	59
4.4. Recuento de levaduras y bacterias por métodos clásicos	60
4.4.1. Recuento en placa	60
4.4.2. NMP	60
5. Ensayos de caracterización fisiológica de levaduras alterantes	61
5.1. Temperatura	61
5.2. Crecimiento a pH bajos	61
5.3. Producción de gas	61
5.4. Estudio de la osmotolerancia y adaptación a glucosa	62
5.5. Crecimiento en medios con conservantes	62
6. Procesado de alimentos para el aislamiento de levaduras	63
7. Cuantificación de fenoles volátiles	64

8. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	64
8.1. Aislamiento de DNA genómico de levadura	64
8.1.1. Método de lisis de protoplastos	64
8.1.2. Extracción por rotura mecánica y sistema “PrepMan Kit”	65
8.2. Tratamientos enzimáticos del DNA	65
8.2.1. Digestión enzimática del DNA mitocondrial	65
8.2.2. Digestión enzimática de amplificadores de la región 5,8S-ITS	66
8.3. Clonación	66
8.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	67
8.4.1. Amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico	67
8.4.2. Amplificación de los dominios D1 y D2 del gen ribosómico 26S	67
8.4.3. Amplificación del gen Actina (ACT1)	67
8.4.4. Amplificación específica de la especie <i>S. cerevisiae</i> para su detección en muestras de vino.	68
8.4.5. Amplificación arbitraria del DNA genómico mediante RAPDs	68
8.4.6. Amplificación de microsatélites	69
8.5. PCR a tiempo real	69
8.5.1. Optimización de la concentración de los cebadores	69
8.5.2. Condiciones de amplificación	69
8.5.3. Curva de disociación	69
8.5.4. Rectas patrón y eficiencia	70
8.5.5. Sensibilidad	70
8.5.6. Detección en muestras de vino contaminadas artificialmente	71
8.5.7. Correlación entre la cuantificación por PCR a tiempo real y por recuento en placa	71
8.5.8. Efecto de la presencia de DNA contaminante en la cuantificación de células de <i>S. cerevisiae</i>	72
8.5.9. Detección y cuantificación en muestras de vino con contaminación real	72
8.6. Secuenciación del DNA	73
8.6.1. Obtención de secuencias	73
8.6.2. Análisis de secuencias	73
9. Análisis estadísticos	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75

Índice

Capítulo 1: Identificación de levaduras del género <i>Debaryomyces</i> mediante secuenciación	75
1.1. Análisis de RFLP de la región 5,8-ITS	77
1.2. Análisis de las secuencias de la región 5,8S-ITS	80
1.3. Análisis de las secuencias de la región D1/D2 (26S rDNA) y del gen de la actina (ACT1) en especies difíciles de identificar	83
1.4. Discusión	86
Capítulo 2: Monitorización de levaduras alterantes durante la producción de turrón de frutas confitadas	91
2.1. Identificación de la levadura causante de la alteración	91
2.1.1. Recuento e identificación de microorganismos en el turrón alterado	92
2.1.2. Recuento e identificación de microorganismos en la empresa de frutas confitadas	92
2.2. Origen de contaminación a lo largo de la cadena de producción de turrón de frutas	95
2.2.1. Estudio comparativo de métodos para la caracterización de cepas de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i>	95
2.2.1.1. Análisis de polimorfismos del DNA mitocondrial	96
2.2.1.2. Amplificación de microsatélites	97
2.2.1.3. Amplificación mediante RAPD-PCR	98
2.2.2. Trazabilidad de cepas de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> en la empresa de frutas confitadas	102
2.3. Discusión	104
Capítulo 3: Caracterización fisiológica de cepas alterantes de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> aisladas de alimentos con alta concentración de azúcares	107
3.1. Características fisiológicas	108
3.1.1. Crecimiento a 4 y 37°C	108
3.1.2. Crecimiento a pH bajo	109
3.1.3. Producción de gas	109
3.2. Tolerancia y adaptación a condiciones extremas	110
3.2.1. Temperatura inhibitoria del crecimiento	110
3.2.2. Osmotolerancia	111
3.2.3. Adaptación a glucosa	112
3.3. Tolerancia a conservantes alimentarios	113
3.4. Discusión	115

Capítulo 4. Estudio del origen de contaminación en vinos por levaduras productoras de 4-etilfenol	121
4.1. Aislamiento e identificación de levaduras productoras de 4-etilfenol	122
4.2. Caracterización molecular de aislados de <i>D. bruxellensis</i> y <i>P. guilliermondii</i>	122
4.2.1. <i>Dekkera bruxellensis</i>	123
4.2.2. <i>Pichia guilliermondii</i>	125
4.3. Producción de 4-etilfenol por cepas de <i>D. bruxellensis</i> y <i>P. guilliermondii</i>	128
4.4. Discusión	130
Capítulo 5: Identificación rápida y cuantificación de levaduras de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> directamente de vino mediante PCR a tiempo real	133
5.1. Diseño de oligonucleótidos y especificidad de PCR	135
5.2. PCR a tiempo real en cultivos puros	138
5.2.1. Detección	138
5.2.2. Sensibilidad	138
5.2.3. Eficiencia en la amplificación	140
5.2.4. Cuantificación (correlación entre PCR a tiempo real y la técnica de recuento en placa)	142
5.3. PCR a tiempo real en vino	143
5.3.1. Muestras de vino artificialmente contaminadas	143
5.3.1.1. Detección y sensibilidad	143
5.3.1.2. Efecto de la presencia de DNA contaminante	143
5.3.1.3. Influencia del vino en la eficiencia del sistema de PCR a tiempo real	145
5.3.1.4. Reproducibilidad del método en vino	145
5.3.2. Muestras de vino con contaminación real	147
5.4. Discusión	149
CONCLUSIONES	153
Listado de Tablas y Figuras	155
BIBLIOGRAFÍA	159
Resumen	188

Abreviaturas

Abreviaturas

A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
a_w	Actividad de agua
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA copia de RNA
C	Citosina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Ct	<i>Threshold cycle</i> (Ciclo umbral)
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxi-nucleótidos tri-fosfato
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EF	Etilfenol
g	Gramo
G	Guanina
h	Hora
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaciador interno transcrito)
IGS	<i>Intergenic spacer</i> (Espaciador intergénico)
Kb	Kilobase
L	Litro
Log	Logaritmo
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanogramo
NT	Cepa neotipo
mtDNA	DNA mitocondrial
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	Peso/volumen
R^2	Coefficiente de correlación
RNA	Ácido ribonucleico
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rDNA	DNA ribosómico

Abreviaturas

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i> (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)
rRNA	RNA ribosómico
T	Timina
T	Especie Tipo
T_m	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)
TMI	Temperatura mínima inhibitoria
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> e (Dodecil sulfato sódico)
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micra

Introducción

1. Las levaduras alterantes de alimentos.

Las levaduras se definen como microorganismos eucariotas del reino Fungi, cuyo crecimiento vegetativo se produce en su mayoría a partir de la gemación o fisión binaria, y cuyas esporas sexuales no se forman en el interior de cuerpos fructíferos (Kurtzman y Fell, 1998). La mayor parte de las levaduras se consideran unicelulares, con un solo núcleo y una estructura de pared celular variable, lo que ha permitido su clasificación en Ascomycetos y Basidiomycetos. Algunas especies se caracterizan por formar pseudohifas o incluso hifas verdaderas. Las células vegetativas pueden presentar morfologías muy variadas, determinándose en algunas especies la formación de esporas asexuales. Muchas levaduras presentan reproducción sexual, formando ascas o basidios, estructuras donde tiene lugar la meiosis y que definen el estado perfecto (teleomórfico) de la levadura. Pueden tener ciclos de vida muy complejos, además de ser muy variables en cuanto a sus capacidades fisiológicas.

Las levaduras están consideradas como el grupo más importante de microorganismos, y han sido utilizadas durante siglos por el hombre por su interés comercial, en la producción de pan, vino, cerveza, sidra y otras bebidas alcohólicas. Este beneficio se obtiene gracias al crecimiento de las levaduras, que mediante la producción de alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos y gases, dan lugar al desarrollo de sabores y aromas característicos (Deák y Beuchat, 1996). Además, estas propiedades son a menudo específicas de la cepa, por lo que su uso en procesos de producción de alimentos fermentados es esencial para mantener la calidad y consistencia del producto (Deák, 1995; Tornay-Lehoczki y Dlauchy, 2000). Recientemente se ha incrementado su uso en la producción de otros alimentos fermentados, como carnes y quesos, y en la producción de diferentes productos metabólicos, incluyendo enzimas, lípidos y vitaminas (Deák, 1991).

A pesar del enorme beneficio económico que se puede derivar del uso de las levaduras para la producción de alimentos y otros metabolitos, existe también un aspecto negativo debido a su potencial como alterantes de alimentos. Este aspecto negativo no ha sido tan considerado como el beneficio que reportan en la industria alimentaria. Sin embargo, en la actualidad se ha incrementado el interés por la alteración de alimentos y bebidas por levaduras (Thomas, 1993). El uso de tecnologías modernas en el procesado de alimentos, la gran variedad de nuevas formulaciones de alimentos y bebidas, la tendencia a reducir el uso de conservantes (especialmente aquellos que son efectivos frente a levaduras, como el dióxido de sulfuro y el ácido benzoico), y la aplicación de

procesados menos severos, han provocado un aumento en la frecuencia de los sucesos de alteración por levaduras (Fleet, 1999; Loureiro y Querol, 1999).

1.1. Concepto de alteración del alimento.

La alteración de alimentos y bebidas es un concepto que, en algunos casos, no está bien definido. Esto ocurre fundamentalmente en alimentos fermentados, donde la actividad de la levadura es esencial durante el proceso y cuya producción de metabolitos contribuye al aroma y sabor del producto final. De hecho, por razones culturales, existe muy poca diferencia entre lo que se percibe como alteración o como actividad beneficiosa (Fleet, 1992). Existen casos extremos en los cuales la alteración resulta muy evidente, (latas de refrescos abombadas, vino turbio fermentado, colonias en la superficie de carnes u oscurecimiento de zumos de frutas), pero esto ocurre cuando la población de levaduras alcanza entre 100.000 y 1 millón de UFC/mL, en función del alimento y de la especie de levadura implicada.

Aunque la alteración por levaduras no produce un deterioro significativo de las propiedades nutricionales del alimento, a menudo el consumidor percibe estos cambios. Teniendo esto en cuenta, el concepto de alteración depende enteramente de las objeciones del consumidor y se podría definir como “el crecimiento de levaduras en el alimento, suficiente como para causar alteración en ese alimento, perceptible por el consumidor, y que produce insatisfacción, queja o rechazo del alimento por parte de éste” (Stratford, 2005).

1.2. Principales levaduras alterantes.

En la actualidad existen aproximadamente 800 especies de levadura descritas (Barnett, 2000), aunque en los últimos años, este número ha ascendido hasta aproximadamente 1000 especies (Boekhout, 2005). Sin embargo, sólo un pequeño grupo es responsable de la alteración de alimentos. Pitt y Hocking (1997) señalaron que alrededor de 110 especies de 30 géneros diferentes estaban asociadas a alimentos, y sólo 10-12 especies producían alteración en alimentos procesados y envasados según las normas para una buena práctica de fabricación (Tabla 1). Tudor y Board (1993) presentaron una lista similar de las levaduras alterantes más comunes, mientras que Stratford y colaboradores (2000) consideran únicamente las levaduras alterantes de zumos de frutas y refrescos. Estas levaduras constituyen el denominado Grupo 1 descrito por Davenport (1996, 1997, 1998), donde se encuentran las especies alterantes más

peligrosas. En este grupo cabe destacar las especies *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii* y *Dekkera bruxellensis* y algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que pueden producir graves signos de alteración en el alimento. Sin embargo, existen además otras levaduras que pueden producir alteración en menor grado. Así, en un segundo grupo encontramos las levaduras oportunistas, como por ejemplo *S. cerevisiae*, que sólo causan alteración por errores en la fabricación (levaduras alterantes y de higiene), mientras que el tercer grupo lo forman levaduras como *Rhodotorula* o *Sporobolomyces* cuya presencia es un indicador de falta de higiene en la industria (levaduras de higiene) (Davenport, 1996).

1.3. Alimentos susceptibles a alteración.

Las levaduras tienen unos requerimientos nutricionales basados en azúcares (fuente de carbono), aminoácidos (fuente de nitrógeno), vitaminas y minerales, que se encuentran habitualmente en los alimentos. No es de extrañar, por tanto, que estén implicadas en la alteración de un amplio rango de alimentos, tales como frutas y verduras frescas y procesadas, productos con alto contenido en azúcar y sal (jarabes, concentrados, mayonesa y salsas), productos de panadería, productos fermentados, bebidas alcohólicas (vino, cerveza, sidra), productos lácteos (yogurt, queso, leche, mantequilla), cereales, carnes y mariscos (Tabla 2).

Sin embargo, los alimentos que contienen azúcares, aminoácidos, minerales y vitaminas, son también susceptibles a la colonización por bacterias. Las levaduras presentan un crecimiento lento con respecto a las bacterias, lo que las sitúa en desventaja en cuanto a la colonización y alteración de un alimento. Por ello, la alteración por levaduras está limitada a aquellos alimentos cuyas condiciones ambientales de pH, actividad de agua (a_w), temperatura, carencia de oxígeno y adición de conservantes supongan una limitación para el crecimiento bacteriano, ya que muchas presentan una elevada tolerancia a las mismas (Deák y Beuchat, 1996). Además su capacidad para metabolizar azúcares (glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y lactosa), tanto de forma aeróbica como anaeróbica, hidrolizar proteínas y degradar lípidos (Deák y Beuchat, 1996; Fleet, 1992), explicaría su presencia en determinados alimentos (Tabla 2).

Introducción

Tabla 1. Especies de levadura más significativas y comúnmente descritas como alterantes de alimentos.

Pitt y Hocking (1997)	Tudor y Board (1993)	Grupo 1 de Davenport ^a
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Candida holmii</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Brettanomyces naardenensis</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula spp</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Torulopsis holmii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

^a En Stratford y col., 2000

Nota: cambios recientes en la nomenclatura (Barnett y col., 2000; Kurtzman, 2003)

Brettanomyces intermedius=*Brettanomyces bruxellensis*=***Dekkera bruxellensis***

Brettanomyces anomalus=***Dekkera anomala***

Candida krusei=***Issatchenkia orientalis***

Candida holmii= *Torulopsis holmii*= *Saccharomyces exiguus*=***Kazachstania exigua***

Kloeckera apiculata= ***Hanseniaspora uvarum***

Zygosaccharomyces microellipsoides=***Torulaspota microellipsoides***

Tabla 2. Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas.

Producto (ejemplos)	Levaduras	Referencia
Frutas Uva, manzana, fresa, cereza, higo, frutas tropicales, naranjas	<i>Hanseniospora spp.</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>P.</i> <i>membranaefaciens</i> , <i>P. fermentans</i>	Lachaise ,1977; Guerzoni y Marchetti, 1987; Spencer y col., 1992
Verduras Verduras frescas y procesadas, ensaladas	<i>Candida spp.</i> , <i>Cryptococcus spp.</i> , <i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i>	Parish y Carroll, 1985; Collins y Buick, 1989; Babic y col., 1992
Zumos de frutas y refrescos Zumos frescos y procesados, refrescos	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dekkera anomala</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Sadler y col., 1992; Sand, 1974; Cole y col., 1987; Deák y Beuchat, 1993, 1994; Kisko <i>et al.</i> , 2005
Bebidas alcohólicas Vino	<i>Dekkera spp.</i> , <i>Saccharomycodes ludwigii</i> , <i>Candida vini</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>I.</i> <i>orientales</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>	Goswell, 1986; Sancho y col., 1986; Chatonnet y col., 1992; Ibeas y col., 1996; Constantí y col., 1997; Stender y col., 2001; Dias y col., 2003a
Cerveza	<i>Saccharomyces spp.</i> , <i>Dekkera spp.</i> , <i>P.</i> <i>fermentans</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbrueckii</i>	Lawrence, 1988; van der Aa Kuhle y Jespersen, 1998
Sidra	<i>P. membranaefaciens</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>S. ludwigii</i> , <i>S. pombe</i>	Carr, 1984; Morrissey y col., 2004
Productos lácteos Leche, nata, mantequilla, yogurt, queso	<i>Candida spp.</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>Cryptococcus spp.</i> , <i>S. roseus</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>Z.</i> <i>microellipsoides</i>	Green y Ibe, 1987; Brocklehurst y Lund, 1985; Fleet, 1990a; Caggia y col., 2001; Cappa y Cocconcelli, 2001
Carnes y pescados Carne roja fresca, pollo, carne procesada, pescado, marisco	<i>Candida spp.</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Trichosporon spp.</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>spp.</i> , <i>Y. lipolytica</i>	Fung y Liang, 1990; Diriye y col., 1993; Fleet, 1990b; Deak, 2001

Introducción

Continuación Tabla 2

Producto (ejemplos)	Levaduras	Referencia
Cereales y productos de panadería Avena, trigo, maíz, pan	<i>Candida spp.</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S. roseus</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Trichosporon spp.</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>P. membranaefaciens</i>	Petters y col., 1988; Legan y Voysey, 1991
Alimentos con elevado contenido en azúcar o sal Mermelada, jarabe, concentrados, frutas confitadas, dulces	<i>Z. rouxii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>T. delbruecki</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>P. anomala</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Candida spp</i>	Tilbury, 1980a; Tokouka y col., 1985; Jermini y col., 1987
Alimentos fermentados y conservados con ácidos orgánicos Col ácida, aceitunas, mayonesa, aliños, carne fermentada	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. anomala</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. membranaefaciens</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>T. delbruecki</i>	Brocklehurst y Lund, 1984; Pitt y Hocking, 1988; Kurtzman, 1990; Marquina y col., 1992

1.4. Efecto de las levaduras en la alteración de los alimentos.

Los efectos producidos como consecuencia de la actividad metabólica de las levaduras son muy variados, resultando más o menos obvios para el consumidor.

El signo más visible de la alteración por levaduras es el exceso de producción de gas, que puede provocar la deformación de envases y latas, e incluso la explosión de botellas de vidrio (Grinbaum y col., 1994; Pitt y Hocking, 1988). El exceso de producción de gas es el resultado de la fermentación de azúcares, a partir de diversos substratos (Barnett y col., 2000). Además, el volumen de gas producido y, por tanto, la presión formada, varía entre las especies de levadura, siendo *Z. bailii*, *S. cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis* y *Saccharomyces ludwigii* las que dan lugar a una mayor presión de gas.

Otro signo obvio de alteración es la aparición de células de levadura en el alimento. Las colonias se pueden formar en la superficie del alimento, produciendo decoloración o formando finas películas de aspecto mucoso. En alimentos sólidos, es más típico encontrar colonias rosas o rojas, formadas por levaduras del género *Sporobolomyces* o *Rhodotorula spp* (Pitt y Hocking, 1997). En las bebidas, las levaduras alterantes pueden formar turbidez, partículas, películas en la superficie o colonias y sedimentos en la base de las botellas. Las especies del género *Dekkera* pueden formar densas partículas en refrescos, mientras que la floculación ha sido asociada a levaduras pertenecientes a *S.*

cerevisiae, *Z. bailii* y *S. ludwigii* (Stratford, 1992; Suzii y col., 1992). La formación de películas en la superficie se ha descrito con frecuencia en diversas especies de los géneros *Candida* y *Pichia*. Sin embargo, en el caso de jarabes con alto contenido en azúcar, esta característica es típica de todas las levaduras alterantes. Esto es debido a la elevada densidad que puede alcanzar el jarabe de azúcar, provocando que las células floten en la superficie.

Para el consumidor, los aromas y sabores desagradables se perciben como signos menos evidentes. El crecimiento y metabolismo de las levaduras va acompañado por la producción de moléculas pequeñas, pero organolépticamente poderosas, que habitualmente son volátiles y producen malos aromas y sabores. Los malos sabores se deben a menudo al exceso de etanol, mientras que los malos aromas están asociados a la producción de acetaldehído, ácido acético, etil-acetato o acetoína. Entre las levaduras productoras de aromas indeseables cabe destacar la especie *D. bruxellensis* que produce 4-etilfenol y 4-etilguayacol, dando lugar a aroma de “establo” (Chatonnet y col., 1992, 1995, 1997). Recientemente, Dias y colaboradores (2003a) señalaron la capacidad de *P. guilliermondii* para producir elevadas cantidades de compuestos fenólicos. Otras especies a destacar serían *S. ludwigii*, que forma altos niveles de acetoína y acetaldehído (Romano y col., 1999) o *Z. rouxii* y *D. hansenii*, que al degradar el ácido sórbico producen 1,3-pentadieno, dando lugar a olor a petróleo (Casas y col., 1999, 2004).

1.5. Niveles aceptables de levaduras en alimentos.

Según las recomendaciones establecidas para el análisis de peligros y control de puntos críticos en alimentos, los límites de microorganismos deben establecerse en base a las características de alimento, y aplicarse de forma variada, teniendo en cuenta los cambios en la microflora durante su almacenamiento y distribución.

A diferencia de las bacterias, no existe una legislación estricta en cuanto a niveles máximos de levaduras en alimentos. Para algunos alimentos, como frutas confitadas o alimentos con alto contenido en azúcar, se proponen niveles que no excedan los 200-300 UFC/mL.

En el caso del vino, la OIV (Oficina Internacional de la Vid y el Vino, autoridad reguladora de países productores), no define un nivel máximo de contaminación microbiana. La única condición es mantener una apariencia clara de la botella, lo que supone una carga microbiana inferior a 10^4 y 10^5 UFC/mL (vinos blancos) para microorganismos que producen sedimentos que flotan, o menos de 10^2 - 10^3 UFC/mL para microorganismos floculantes (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Sólo se conoce límite

Introducción

legal en Noruega, permitiendo un máximo de 10 UFC/mL de microorganismos totales en tanques de vino. Generalmente, los vinos dulces y/o blancos tienen mayor restricción de niveles aceptables, ya que el crecimiento de la levadura es mayor o más evidente que en vinos secos y/o tintos. Sin embargo, esta generalización no es extensible a especies del género *Dekkera/Bretanomyces*, productoras de concentraciones de 4-etilfenol por encima del umbral (620 µg/µL) (Chatonnet y col., 1992). Por otra parte, estudios centrados en la especie *Z. bailii* demuestran que unas pocas células viables en botella pueden ser suficientes para causar alteración en vinos (Deak y Beuchat, 1996). Loureiro y Malfeito-Ferreira (2003), muestran datos interesantes de distintas bodegas. Los niveles aceptables varían en función del contenido en azúcar residual en el vino, y el tiempo hasta su consumo. Así, para vinos con más de 5 g/L de azúcar residual se aceptaría un máximo de 2 UFC/250mL, mientras que en vinos secos blancos y tintos se permitirían de 5 a 15 UFC/100 mL, dependiendo de la bodega. En el caso de vinos que se consumen rápidamente, se admiten niveles mayores, hasta 100 UFC/mL.

1.6. Consecuencias económicas de la alteración por levaduras.

Para poder estimar las pérdidas económicas a escala mundial como consecuencia de la alteración por levaduras, es necesario considerar los alimentos que son consumidos sin que sea percibida su alteración. Además, es importante conocer el grado de quejas y rechazos por parte del consumidor en aquellos casos de alteración más evidente. La estimación de los niveles de alteración que se producen en alimentación es difícil de precisar, sin embargo, los costes pueden alcanzar el millón o incluso el billón de euros al año. Además, las industrias alimentarias no siempre hacen públicas las incidencias producidas por la alteración, ya que no supone un riesgo importante para la salud pública y es un modo de proteger la imagen de la marca del producto. De este modo, el orden de magnitud de las alteraciones producidas es mucho mayor que el descrito en las publicaciones (Fleet, 1992).

1.7. Control de la alteración de alimentos: sistemas de conservación.

En la fabricación de alimentos, es necesario establecer un balance entre la calidad del producto y su estabilidad y seguridad (Brul y col., 2003). La estabilidad microbiológica del alimento depende de varios factores, no sólo del nivel y tipo de levadura contaminante, sino también de las condiciones intrínsecas e ingredientes del alimento, así como de unas buenas prácticas de fabricación. Entre estas prácticas están los

sistemas de conservación, que pueden considerarse como una composición de factores: la conservación física y química, las medidas de higiene, envasado y almacenamiento del producto. Así, el alimento puede presentar bajo pH, baja a_w , carencia de nutrientes o presencia de aceites esenciales. Las medidas de conservación físicas incluyen la aplicación de altas temperaturas y pasteurización, refrigeración, gasificación o atmósferas modificadas, mientras que los conservantes químicos incluyen el ácido sórbico, ácido acético y ácido benzoico. En la mayoría de los casos se utilizan distintos métodos de forma combinada, ya que la aplicación de un solo factor puede ser insuficiente como antimicrobiano.

1.7.1. Inhibición por conservantes químicos.

Un conservante químico se define como cualquier compuesto químico que, al añadirse al alimento, tiende a prevenir o retardar su deterioro, pero que no incluye sales y azúcares comunes, vinagres, especias (o sus aceites) o sustancias químicas aplicadas por sus propiedades insecticidas o herbicidas (Food and Drug Administration, 1979). Tales conservantes deben ser definidos como seguros por las autoridades reguladoras de cada país (Deák y Beuchat, 1996). Para el control de la alteración de alimentos, se han utilizado con éxito distintos conservantes, siendo los más utilizados los ácidos orgánicos débiles. Algunos ejemplos son el ácido sórbico, ácido benzoico y ácido acético, y se emplean debido a su relativa baja toxicidad, a su mera presencia en los alimentos, junto con sabores y aromas característicos, bajo coste y extendida aplicación (Stratford, 2005).

El ácido sórbico y el ácido benzoico son conservantes permitidos en Europa, pero sólo se pueden añadir a niveles específicos en determinados alimentos (Anon., 1989) (Tabla 3). El uso de estos conservantes está muy extendido en alimentos tan diversos como jarabes de frutas, dulces, productos de panadería, vino y refrescos, cereales e incluso pastas (Faid y col., 1995; Ranking y Pilone, 1974; Sand, 1973; Stratford y Eklund, 2003). Además es muy común su utilización en forma de mezclas, lo que permite reducir su concentración (Taylor, 1998). Se ha sugerido que el ácido sórbico es más inhibitorio que el ácido benzoico, sin embargo el ácido sórbico funciona mejor frente a la alteración a pH 3 (Stratford, 2005).

El ácido sórbico es un ácido mono-carboxílico α , β -insaturado, mientras que el ácido benzoico está comprendido por un anillo de benceno con un grupo carboxílico. Su estructura les confiere la ventaja de tener poco sabor y baja toxicidad, lo que supone una mayor seguridad para el consumo humano (Ferrand y col., 2000). Normalmente, estos

Introducción

conservantes se añaden a los alimentos como sales solubles, en forma de benzoato sódico y sorbato potásico.

El ácido acético, en pequeñas cantidades, es un componente natural de aceites de frutas cítricas (Burdock, 1995). Además, puede ser producido por la fermentación de muchas levaduras y las bacterias ácido-acéticas que metabolizan el etanol de bebidas fermentadas por levaduras. El ácido acético está reconocido en Europa como un acidulante, sin un límite establecido para su uso (Tabla 3) (Anon., 1989). Algunos alimentos donde es aplicado son el ketchup, escabeche, mayonesas, aliños de ensalada y té fermentado (Kombucha).

Otro conservante que ha sido utilizado durante siglos de forma tradicional para la producción de vino, sidra y cerveza es el dióxido de azufre (SO₂). Actualmente están permitidos en Europa para su uso en vino y sidra (Tabla 3).

Finalmente, cabe nombrar otros conservantes que, rutinariamente se utilizan en la industria para controlar los efectos de las levaduras, como el ácido fórmico, succínico, láctico y cítrico, peróxido de hidrógeno o DMDC. Éste último se utiliza en bajos niveles (Tabla 3), para la elaboración de sidra y vinos, infusiones y bebidas energéticas (Anon., 1995; Anon., 2004).

La efectividad de los conservantes de tipo ácido orgánico débil está estrechamente relacionada con el pH del ambiente, debido a la influencia que produce sobre el grado de disociación del conservante. Así, A pH bajo, la forma no disociada del conservante puede difundir fácilmente a través de la membrana plasmática de la célula hacia el citosol. En el interior celular, el pH más elevado provoca una disociación del ácido dando lugar a un anión y un ión de hidrógeno, que tiene efectos potencialmente inhibitorios para la célula (Holyoak y col., 1996; Krebs, 1983; Piper y col., 2001). Sin embargo, existe un amplio grupo de levaduras resistentes a conservantes cuyo nivel de resistencia varía, en ocasiones, dentro de una misma población de células (Steels y col., 2000). Esto está suponiendo un nuevo reto para la industria alimentaria a la hora de aplicar los sistemas de conservación alimentaria, ya que, ante la demanda de los consumidores, deben conseguir alimentos de gran calidad, libres de conservantes y seguros (van der Vossen y Hofstra, 1996)

Tabla 3. Principales conservantes químicos utilizados en la industria alimentaria y su regulación según la normativa europea vigente (Anon., 1995; Anon., 2004).

Conservante	Categoría alimentaria	Nivel máximo (mg/kg o mg/L)	Año ^a
Benzoatos (Ácido benzoico, benzoato potásico)	Postres lácteos	300	2001
	Mermeladas, frutas confitadas, postre y fermentados de frutas, zumos y concentrados, sidra, vino, cerveza.	1000	2001, 2003 y 2004
	Chocolate, dulces, turroneos	1500	2003
Sorbatos (Ácido sórbico, sorbato potásico, sorbato cálcico)	Frutas y hortalizas confitadas, purés de frutas, jarabes, helados, salsas, ensaladas, quesos	1000	1995 y 1998
	Productos de panadería	2000	1995 y 1998
	Bebidas no alcohólicas	300	1995
Dimetildicarbonato	Infusiones (té, café, cereales), sidra	250	2004
	Vino (uva)	200	2004
SO₂ (dióxido de azufre, sulfito o metabisulfito sódico o cálcico)	Carne fresca y procesada	450	1998
	Pescados y mariscos	300	1998
	Cereales, zumos, cerveza	50	1995
	Frutas y hortalizas confitadas	100	1995
	Mermeladas y confituras	100	1995
	Frutas desecadas, zumo concentrado uva	2000	1995
	Sidra	200	1995
	Vino	Según reglamento CEE	
Ácido acético		<i>Quantum satis</i> ^b	1989

^a Año en que se adoptó la normativa respecto a un determinado alimento. ^b No existen unos niveles máximos de uso de este conservante.

1.7.2. Otros factores que constituyen sistemas de conservación del alimento.

Como se ha comentado anteriormente, además de la aplicación de conservantes químicos, existen otros factores, físicos o intrínsecos del alimento, que son efectivos para la conservación del mismo.

Los tratamientos térmicos son muy utilizados y de gran efectividad. La intensidad de su aplicación dependerá del interés en destruir esporas bacterianas o células vegetativas.

Introducción

Las levaduras son relativamente sensibles a las altas temperaturas, resistiendo un máximo de 45°C y 53°C. Las especies más termoresistentes son *S. cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *P. anomala*, *P. galeiformis* y *Candida albicans* (Tchango Tchango y col., 1997). En general, tratamientos de 60°C durante 20 minutos son suficientes para destruir una población de 10⁵ UFC/mL (Stratford, 2005), aunque la presencia de determinados solutos o de levaduras en fase estacionaria de crecimiento, pueden incrementar el grado de resistencia térmica (Iwahashi y col., 1995). De igual forma que los tratamientos térmicos, la conservación del alimento a bajas temperaturas es una práctica muy extendida. Sin embargo, algunas especies de *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, junto con *Debaryomyces hansenii* pueden crecer por debajo de 5°C (Margesin y col., 2002; Stratford, 2005).

Otras características del alimento, como el pH y la a_w , son determinantes para el crecimiento de las levaduras alterantes. Así, las levaduras son muy resistentes a pH bajos, por lo que están asociadas a alimentos ácidos como refrescos, sidra, zumos de frutas o zumo de tomate (Hicks, 1990). Los alimentos con baja a_w se caracterizan por contener elevadas cantidades de azúcar o sal, que inhiben el crecimiento mediante mecanismos diferentes (Watanabe y col., 1995). Algunas levaduras se describen como osmófilas, ya que pueden crecer en alimentos con más del 67% de azúcar (Tilbury, 1980a, 1980b). Así, especies como *D. hansenii*, *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. lentus*, y especialmente *Z. rouxii* y *Z. mellis*, se han descrito como levaduras alterantes de alimentos como miel, mazapán, dulces, mermeladas, turrón y jarabes (James y Stratford, 2003; Tilbury, 1980a, 1980b; Tokuoka, 1993). Los mecanismos de resistencia que se han descrito se basan en la acumulación de altas concentraciones de solutos, como glicerol y arabitol, en el interior de la célula (Tokuoka, 1993).

Mientras que la acción antimicrobiana de los azúcares es básicamente osmótica (Martinez de Maranon *et al.*, 1996), la toxicidad por sal es debida a los iones de sodio (Na⁺). La mayoría de especies tolerantes a sal son capaces de crecer hasta 1,5-2 M de cloruro de sodio, e incluyen *D. hansenii*, *Z. rouxii*, y algunas especies de *Candida* (Kurtzman, 1998; Lages y col., 1999; Prista y col., 2005).

Finalmente, la presencia de poco oxígeno en el alimento y la carencia de nutrientes son factores importantes para la prevención de alteración por microorganismos. Cabría esperar que sólo las levaduras que dependen exclusivamente de la respiración se vieran inhibidas por la falta de oxígeno. Sin embargo, algunas especies de levaduras fermentativas, como *S. cerevisiae*, necesitan oxígeno para sintetizar ácidos grasos insaturados y esteroides que constituyen la membrana. Estos requerimientos de oxígeno se han observado también en *Z. bailii* y *Z. bisporus* (Rodrigues y col., 2001a).

Entre los requerimientos nutricionales de las levaduras están las vitaminas. Algunas levaduras alterantes que requieren vitaminas incluyen *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Dekkera bruxellensis* y *Saccharomyces ludwigii* (Barnett, 2000), lo que implica que su presencia esté más restringida a alimentos que contienen este tipo de nutrientes, como bebidas de zumos de frutas. Además, se ha observado que alimentos carentes de iones metálicos, como magnesio, potasio, zinc, hierro o cobre son menos susceptibles a la alteración por levaduras. Sin embargo, algunas levaduras son resistentes a la presencia de agentes quelantes de iones metálicos (como el EDTA, ácido cítrico o ácido málico). Entre ellas, cabe destacar las especies *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *Candida parapsilopsis* e *Issatchenkia orientalis* (Stratford, 2005).

2. Técnicas de identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos.

Como se ha descrito en el apartado anterior, la utilización de métodos de conservación en el alimento no siempre resulta exitosa, ya que las diversas resistencias que desarrollan las levaduras provocan su persistencia en el alimento. Por este motivo, existe una necesidad por parte de la industria de identificar, de manera precisa, las especies de levadura que contaminan un determinado producto, y así aplicar las medidas necesarias para limitar los efectos potenciales de la alteración y las consecuentes pérdidas económicas.

De forma convencional, la identificación de levaduras se ha basado en criterios morfológicos o fisiológicos (Barnett y col., 1990; Kreger-van Rij, 1984). Sin embargo, estas características pueden variar en función de las condiciones de cultivo (Scheda y Yarrow, 1966 y 1968; Yamamoto y col., 1991), y en ocasiones, las especies están delimitadas por una única característica fisiológica controlada por un solo gen. Por tanto, dependen del estado fisiológico de la levadura, como ocurre con la fermentación de la galactosa, que tradicionalmente ha resultado útil a los enólogos para diferenciar las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Kurtzman y Phaff, 1987; Price y col., 1978). Además, ambas aproximaciones son largas y tediosas, siendo inapropiado su uso de forma rutinaria. Recientemente se han desarrollado métodos bioquímicos para la diferenciación de levaduras, basados en el análisis de proteínas totales de la célula (Vacanneyt y col., 1991; Van Vuuren y Van der Meer, 1987), patrones de isoenzimas (Duarte y col., 1999) y análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases (Cottrell y col., 1986; Moreira da Silva y col., 1994; Tredoux y col., 1987). Estos métodos son más

rápidos y más fácilmente estandarizables. Sin embargo, la reproducibilidad de estas técnicas es cuestionable ya que depende del estado fisiológico de las levaduras que puede variar según las condiciones de cultivo (Golden y col., 1994).

Actualmente, los métodos moleculares basados en el polimorfismo de los ácidos nucleicos constituyen la mejor alternativa a los métodos tradicionales, ya que al no depender del estado fisiológico de la célula, son más reproducibles. Además, poseen otras ventajas como la elevada precisión y discriminación, así como rapidez y sencillez en la realización de la técnica. Dichas técnicas moleculares pueden dividirse en función a su aplicación para la identificación a nivel de especie o a nivel de cepa.

2.1. Métodos moleculares para la identificación de levaduras a nivel de especie.

Las técnicas de identificación a nivel de especie son útiles para estudios de biodiversidad, que a su vez son fundamentales para conocer mejor los procesos fermentativos. Como veremos, pueden utilizarse también para la detección de especies de levaduras alterantes.

2.1.1. Métodos basados en el análisis de regiones ribosómicas.

Los genes ribosómicos (5,8S, 18S, y 26S) se agrupan en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma entre 100 y 200 veces (Figura 1). En cada unidad de transcripción existen otras dos regiones, los espaciadores internos (ITS) y los externos (ETS), que se transcriben pero son procesadas y no forman parte de la molécula de rRNA final. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los espaciadores intergénicos IGS también llamados NTS. El gen 5S no se incluye en la unidad de transcripción previamente descrita pero aparece adyacente en la misma unidad de repetición en tandem en el caso de las levaduras. Los genes ribosómicos 5,8S, 18S, y 26S así como los espaciadores ITS y NTS constituyen poderosas herramientas para el establecimiento de las relaciones filogenéticas y la identificación de especies (Kurtzman y Robnett, 1998) por contener secuencias conservadas, así como una evolución concertada. Esto significa que la similitud entre las unidades de transcripción repetidas es mayor dentro de especies que entre unidades de distintas especies, debido a mecanismos como el entrecruzamiento desigual o la conversión genética (Li, 1997).

Usando la información de estas regiones se han desarrollado distintos métodos para la identificación de especies de levaduras como veremos a continuación.

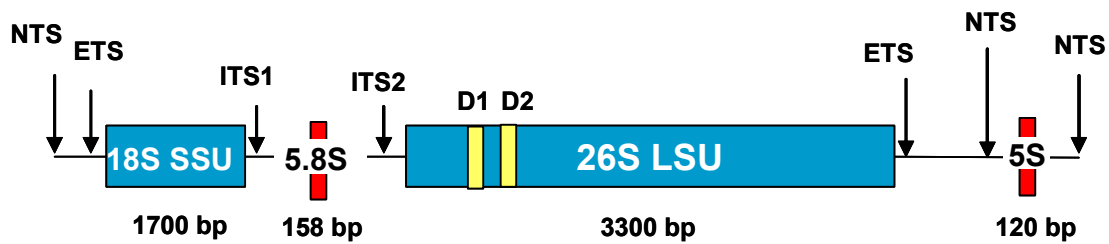


Figura 1. Esquema de la organización de los genes ribosomales.

2.1.1.1. Secuenciación de regiones ribosómicas.

Uno de estos métodos es el basado en la determinación y comparación de secuencias nucleotídicas de estas regiones. Las dos regiones más utilizadas son las correspondientes a los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman y Robnett, 1998) y el gen 18S (James y col., 1997). La disponibilidad de las secuencias en bases de datos, sobre todo en el caso de la región D1/D2 del gen 26S, hacen que esta técnica sea muy útil para asignar una levadura desconocida a una especie concreta cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% (Kurtzman y Robnett, 1998). La comparación con las bases de datos se lleva a cabo usando el programa WU-BLAST2 en la dirección de internet <http://www.ebi.ac.uk/Blas2/index.html>. Además, la aparición de la reacción en cadena de la DNA polimerasa, que permite la secuenciación directa de las regiones de interés, junto con las modernas tecnologías de secuenciación automática, hacen que la aplicación de esta técnica sea relativamente rápida.

2.1.1.2. Análisis de restricción de regiones ribosómicas.

Pensando en una aplicación industrial se desarrollaron paralelamente otros métodos de identificación más sencillos basados en la amplificación por PCR de estas regiones del rDNA y posterior restricción de los amplificadores. Esta técnica se caracteriza por su fácil manipulación y su reproducibilidad. Los amplificadores se visualizan en geles de agarosa al 1,4%, existiendo tamaños de amplificado específicos de especie que nos van a permitir la identificación y diferenciación de las mismas. Aunque lo habitual es usar DNA como molde en la reacción de amplificación, en numerosos trabajos se ha utilizado como molde una pequeña cantidad de colonia aislada, acortando el proceso. Cuando los

Introducción

amplificados son del mismo tamaño no siempre corresponden a la misma especie y es necesario recurrir a la digestión de estos fragmentos para llegar a la definitiva identificación.

Dlauchy y colaboradores (1999) usaron esta metodología para amplificar el gen ribosómico 18S y la región intergénica ITS1 de 128 especies asociadas a alimentos, usando los cebadores NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') e its2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'), y digiriendo con los enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, y *RsaI*. Posteriormente, esta metodología fue usada por Redzepovic y colaboradores (2002). Otra región ribosómica muy útil para diferenciar a nivel de especie es la que incluye el gen 5,8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 que se amplifica mediante los cebadores its1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e its4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por White y colaboradores (1990). Guillamón y colaboradores (1998) aplicaron esta técnica para la rápida identificación de levaduras vínicas y posteriormente ha sido extendida a un total de 191 especies (de Llanos y col., 2004; Esteve-Zaroso y col., 1999; Fernández-Espinar y col. 2000), muchas relacionadas con alimentos y bebidas. Los fragmentos de amplificado y perfiles de restricción de estas especies con los enzimas *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* y *DdeI* están actualmente disponibles "online" en la dirección <http://yeast-id.com/>. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos trabajos para la identificación de levaduras presentes en diversos alimentos (Tabla 4).

También se ha usado el análisis de restricción de otras regiones ribosómicas para la identificación de especies de levaduras. Es el caso de la región denominada NTS (Baleiras-Couto y col., 1996a; Capece y col., 2003; Caruso y col., 2002; Nguyen y Gaillardin, 1997; Pulvirenti y col., 2000). A modo de ejemplo, Romero y colaboradores (2005) utilizaron con éxito la restricción de la región IGS para la diferenciación de las especies *D. hansenii*, *D. polymorphus* y *D. pseudopolymorphus* y otras especies que frecuentemente se encuentran en alimentos de a_w intermedia. Otras regiones abordadas han sido el gen 18S junto al NTS adyacente (Capece y col., 2003) y distintos dominios del gen 26S (Baleiras-Couto y col., 1996a; Smole-Mozina y col., 1997; Van Keulen y col., 2003). Sin embargo, la no disponibilidad de una base de datos para estas regiones, hace que no se puedan usar de forma generalizada para la identificación de levaduras.

2.1.2. PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

La técnica de PCR seguida de una electroforesis en gradiente de desnaturalización se ha introducido recientemente (Muyzer y col., 1993). Mediante PCR-DGGE, los fragmentos de DNA con distintos tamaños pero diferente secuencia pueden ser

separados en geles de poliacrilamida, que contienen un gradiente linear de agentes desnaturalizantes de DNA (una mezcla de urea y formamida). En un gel de DGGE, la doble hebra de DNA se va desnaturalizando parcialmente, ya que contiene regiones discretas llamadas “dominios de fusión”. La temperatura de fusión (T_m) de estos dominios es específica de secuencia. Cuando el fragmento aparece parcialmente desnaturalizado, su movilidad se reduce en el gel de poliacrilamida. Así, fragmentos del mismo tamaño, pero distinta secuencia mostrarán distinto comportamiento en el gradiente de desnaturalización (Ercolini, 2004).

Una técnica relacionada es la PCR-TGGE (electroforesis en gradiente de temperatura), basada en un gradiente de temperatura linear para la separación de las moléculas de DNA. Para ambas técnicas, las bandas de DNA se pueden visualizar con bromuro de etidio, aunque recientemente se ha introducido el uso del SYBR Green I. Los fragmentos de PCR pueden aislarse del gel, y utilizarse en reacciones de secuenciación para la identificación de especie.

El uso tanto del DGGE como del TGGE en ecología microbiana es bastante reciente (Muyzer y Smalla, 1998). Estas técnicas, se han aplicado fundamentalmente para estudios de diversidad de levaduras presentes en alimentos. Aunque se han utilizado para la identificación de bacterias lácticas que producen alteración de carne, queso y productos lácteos (Cocolin y col., 2004a; Ogier y col., 2004), todavía no se conocen trabajos centrados en levaduras alterantes (Ercolini, 2004). En la Tabla 4 se muestran algunas de las recientes aplicaciones para la identificación de levaduras presentes en alimentos.

2.1.3. PCR a tiempo real.

La técnica de PCR a tiempo real surgió en 1996 y desde entonces, su uso se ha incrementado casi exponencialmente (Heid y col., 1996; Wilhelm y Pingoud, 2003). En esta técnica, los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR. La técnica se basa en la detección y cuantificación de un donador fluorescente, cuya señal se incrementa proporcionalmente a la cantidad de producto de PCR de la reacción. El proceso, que se esquematiza en la Figura 2, se lleva a cabo en un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por un donador de fluorescencia al final de cada ciclo para cada muestra. La información obtenida se representa en forma de curva de amplificación que proporciona el número de ciclo al cual la intensidad de emisión del donador aumenta con respecto a la fluorescencia basal (“background noise”). Este número de ciclo se llama

Introducción

ciclo umbral (C_t) y es inversamente proporcional al número de copias de la muestra, por lo que se puede usar para evaluar numéricamente la cantidad inicial de muestra (DNA o células) con gran precisión, dentro de un amplio rango de concentraciones (Schmittgen y col., 2000).

Los sistemas de detección de fluorescencia, que se describen con mayor detalle en el apartado 3.2.1 de introducción, se basan en la utilización de agentes intercalantes de DNA o de sondas. Ambas presentan ventajas e inconvenientes, pero la utilización de un sistema u otro dependerá del grado de especificidad que se quiera obtener.

La PCR a tiempo real posee numerosas ventajas con respecto a otras técnicas de identificación. Cabe destacar la alta especificidad y sensibilidad, la posibilidad de cuantificar y la no necesidad de análisis posterior a la PCR mediante electroforesis (Heid y col., 1996; Mackay y col., 2002). Esto último, junto a la utilización de tiempos de reacción y ciclos reducidos, se traduce en una gran rapidez, lo cual es muy útil en el caso de análisis rutinarios y en aplicaciones que requieran medidas correctoras. Frente a todas las ventajas, hay que tener en cuenta que el diseño de los cebadores y de las sondas es muy exigente pues de ello va a depender la especificidad y la sensibilidad del método.

En la Tabla 4 se describen los escasos trabajos en los que se ha aplicado la técnica de PCR a tiempo real para la identificación de levaduras asociadas a alimentos.

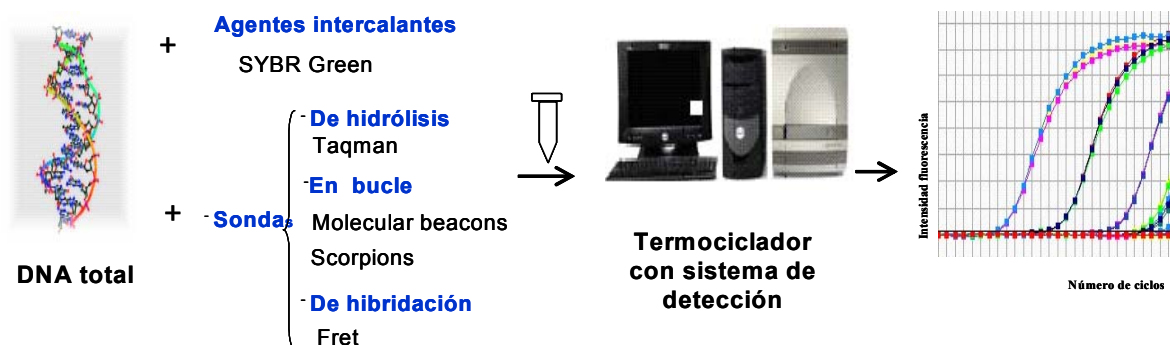


Figura 2. Técnica de PCR a tiempo real.

2.1.4. Otras tecnologías .

Los microchips de DNA se están consolidando como una herramienta muy útil para los investigadores, dada su alta especificidad y sensibilidad. Se trata de dispositivos de pequeño tamaño que contienen miles de fragmentos de material biológico (DNA, RNA, proteínas) dispuestos ordenadamente y de forma conocida sobre un soporte sólido

(portaobjetos, vidrio, plástico). La muestra de DNA que se pondrá en contacto con el microchip habrá de ser marcada para permitir su detección. Los marcadores más comúnmente empleados son los fluorescentes, pero también puede utilizarse marcaje radiactivo o quimioluminiscencia. Cuando se ponen en contacto con una muestra, sólo aquellas cadenas complementarias a las del chip se unen y originan un patrón de luz característico, que se lee con un escáner y se interpreta con un ordenador. Aunque no se ha utilizado hasta el momento para la detección de levaduras, se presenta como una buena alternativa en un futuro próximo. Sin embargo, su complejidad tecnológica puede dificultar su aplicación en la industria.

Otra técnica útil para el análisis de microorganismos viables es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA), que fue descrita por Compton (1991) y está diseñada para la detección de RNA. Para el proceso de amplificación se requieren tres enzimas con actividades coordinadas: transcriptasa reversa AMV, RNasa H y RNA polimerasa T7. Además, se incorporan a la reacción los oligonucleótidos, complementarios a las secuencias diana de RNA, dNTPs y NTPs. El primer oligonucleótido permite a la transcriptasa reversa formar una hebra de DNA complementaria, resultando un híbrido RNA:DNA. Posteriormente, la RNasa digiere el RNA de este híbrido, mientras que el segundo oligonucleótido se une a la hebra simple de cDNA, permitiendo a la transcriptasa reversa formar una copia de doble hebra de cDNA. Este cDNA será utilizado como diana de la RNA polimerasa T7, que transcribe copias de RNA de forma exponencial. La reacción es continua y a una única temperatura, normalmente 41°C. A esta temperatura, el DNA genómico del microorganismo a detectar permanece en doble hebra, por lo que no es un substrato para la amplificación. La reacción NASBA requiere pocos ciclos para producir la amplificación deseada (4 ó 5 ciclos). Existen varias aproximaciones para la detección de los productos, aunque el más simple es la electroforesis en geles de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio. Recientemente, el uso de "molecular beacons" ha permitido la detección a tiempo real de productos NASBA, lo que permite establecer estrategias para la cuantificación (similares a los ensayos de PCR a tiempo real).

La detección de microorganismos mediante NASBA se encuentra en el mismo estado que la PCR hace diez años, con muy poco métodos publicados en prensa científica (Cook, 2003). Por tanto, para su uso rutinario se necesita un mayor desarrollo. Sin embargo, su ventajas en cuanto a rapidez y precisión son equiparables a la PCR, por lo que resulta muy prometedora como herramienta en la detección de levaduras viables en el alimento.

Introducción

Tabla 4. Trabajos recientes (últimos 5 años) donde se aplican técnicas moleculares para la identificación de levaduras asociadas a alimentos y bebidas.

Técnica	Especies diana	Matriz alimentaria	Referencias (de 2000 a 2005)
Secuenciación	<i>S. cerevisiae</i>	Cerveza	van der Aa Kuhle y col., 2001
	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	Queso, yogurt	Cappa y Cocconcelli, 2001
	<i>S. cerevisiae/ S. uvarum/ no-Saccharomyces</i> ^(a)	Zumo de naranja	Arias y col., 2002
	<i>Zygosaccharomyces kombuchaensis</i>	Té fermentado	Steels y col., 2002
	<i>S. cerevisiae /Candida humilis</i>	Masa de pan	Foschino y col., 2004
	<i>no-Saccharomyces</i> ^(b)	Café fermentado	Masoud y col., 2004
	<i>Saccharomyces spp/ Candida boidinii/ Geotrichum candidum</i>	Aceite de oliva	Giannoutsou y col., 2004
	<i>S. cerevisiae/no-Saccharomyces</i> ^(c)	Cacao fermentado	Jespersen y col., 2005
RFLPs de PCR (5,8S- ITS, IGS)	<i>Yarrowia lipolytica/ Candida zeylanoides</i>	Aves	Deak y col., 2000
	<i>S. cerevisiae/ S. kluyveri/ no-Saccharomyces</i> ^(d)	Vino	Pramateftaki y col., 2000
	<i>Pichia anomala</i>	Yogurt	Caggia y col., 2001
	<i>S. cerevisiae</i>	Cerveza	van der Aa Kuhle y col., 2001
	<i>S. cerevisiae/ S. uvarum/no-Saccharomyces</i> ^(a)	Zumo de naranja	Arias y col., 2002
	<i>S. cerevisiae/ S. unisporus/no-Saccharomyces</i> ^(e)	Naranja y zumo de naranja	Las Heras-Vazquez y col., 2003
	<i>Saccharomyces sensu stricto</i>	Cerveza	Naumova y col., 2003
	<i>S. cerevisiae/non-Saccharomyces</i> ^(f)	Vino	Ganga y Martínez, 2004
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Cappello y col., 2004
	<i>S. cerevisiae/S. exiguous/no-Saccharomyces</i> ^(g)	Masa de pan	Pulvirenti y col., 2004
<i>D. hansenii/ D. pseudopolymorphus/ D. polymorphus</i>	Mazapán, miel, concentrado frutas, jamón, chorizo, queso	Romero y col., 2005	
PCR-DGGE/TGGE	<i>S. cerevisiae/no-Saccharomyces</i> ^(h)	Vino	Cocolin y col., 2000
	<i>Saccharomyces/no-Saccharomyces</i> ⁽ⁱ⁾	Vino	Mills y col., 2002
	<i>S. cerevisiae/no-Saccharomyces</i> ^(j)	Masa de pan	Meroth y col., 2003
	<i>S. cerevisiae/no-Saccharomyces</i> ^(k)	Café fermentado	Masoud y col., 2004
	<i>No-Saccharomyces</i> ^(l)	Uvas	Prakitchaiwattana y col., 2004
	<i>S. servazzii/ D. hansenii</i>	Escabeche	Tominaga, 2004
	<i>S. cerevisiae/no-Saccharomyces</i> ^(m)	Cacao fermentado	Nielsen y col., 2005
	<i>S. cerevisiae/ S. paradoxus</i>	Vino	Manzano y col., 2005

Continuación Tabla 4

Técnica	Especies diana	Matriz alimentaria	Referencias (de 2000 a 2005)
PCR a tiempo real	<i>D. bruxellensis</i>	Vino	Phister y Mills, 2003
	Levaduras alterantes ⁽ⁿ⁾	Yogurts, leche, queso, zumo frutas	Bleve y col., 2003
	Levaduras alterantes ^(o)	Zumos frutas	Casey y Dobson, 2004
	<i>D. bruxellensis</i>	Vino	Delaherche y col., 2004

^(a) *Candida*, *Clavispora*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis* y *Torulaspora* spp. ^(b) *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora* spp. ^(c) *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, y *Trichosporon* spp. ^(d) *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *M. pulcherrima* y *Torulaspora delbruckii* ^(e) *Candida*, *Clavispora*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Trichosporon* spp. ^(f) *Candida krusei*, *Rhodotorula glutinis* y *Zygosaccharomyces* spp. ^(g) *Issatchenkia orientalis* y *Candida* spp. ^(h) *Candida ethanolica*, *K. apiculata* y *M. Pulcherrima* ⁽ⁱ⁾ *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Metschnikowia* spp. ^(j) *Candida humilis*, *D. hansenii* y *Saccharomyces uvarum* ^(k) *H. uvarum*, *I. orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida* y *Pichia* spp. ^(l) *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora* y *Metschnikowia* spp. ^(m) *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia membranaefaciens* y *Candida* spp. ⁽ⁿ⁾ *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* spp. ^(o) *Zygosaccharomyces bailii* y *rouxii*, *C. krusei*, *R. glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Métodos moleculares para la diferenciación a nivel de cepa.

La caracterización a nivel de cepa es necesaria para poder patentar levaduras de interés industrial, para el seguimiento de las levaduras en procesos industriales, así como para determinar el origen de contaminación en alimentos alterados.

2.2.1. Electroforesis de cromosomas en campo pulsante.

En esta técnica, la aplicación alterna de dos campos eléctricos transversos provoca que los cromosomas cambien continuamente su dirección de migración, evitando que queden retenidos en el entramado del gel de agarosa y permitiendo separar los fragmentos de DNA de gran tamaño (Lai y col., 1989). Los parámetros que condicionan la resolución de las bandas son los intervalos de variación de la fuerza del campo eléctrico, la concentración de agarosa, la temperatura y el ángulo entre los campos eléctricos.

El uso de la técnica ha resultado de gran interés para determinar las relaciones taxonómicas en levaduras (Belloch y col., 1998) y en la identificación de cepas de interés en las fermentaciones vínicas (Puig y col., 2000). Así, en cepas de *S. cerevisiae* el polimorfismo revelado es resultado de la adición o eliminación de largos fragmentos de DNA en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de las levaduras (Casaregola y col., 1998; Keogh y col., 1998; Wolfe y Shields, 1997). Aunque el cariotipado de cromosomas de levaduras resulta muy útil para generar perfiles específicos para la caracterización de cepas, los polimorfismos se han observado también entre diferentes especies, lo que limita su uso en el análisis de un gran número de levaduras alterantes. La complejidad y larga duración del proceso, junto con el equipamiento especializado necesario, limitan aún más su aplicabilidad para la caracterización rutinaria de levaduras (Deák, 1995). Existen varios trabajos centrados en la caracterización de levaduras mediante el análisis de polimorfismos. A modo de ejemplo, Mitrakul y colaboradores (1999), utilizaron esta técnica para tipificar cepas de *D. bruxellensis* aisladas de vino. Otros trabajos en este campo se detallan en la Tabla 5.

2.2.2. Análisis de restricción del DNA mitocondrial.

El análisis de polimorfismos mediante restricción del DNA mitocondrial, ha sido ampliamente utilizado como método de caracterización de cepas estrechamente relacionadas de origen vínico y cervecero (Vezinhet y col., 1990). El DNA mitocondrial de *S. cerevisiae* es una pequeña molécula de 65 a 80 kb cuyo grado de variabilidad puede ser puesto de manifiesto por restricción. El alto grado de polimorfismo que revela esta molécula entre cepas vínicas de *S. cerevisiae* hace que esta técnica sea una de las más aplicadas para la caracterización de este tipo de aislados.

Se han desarrollado varios métodos para el aislamiento del mtDNA de levadura (Aiglé y col., 1984; Gargouri, 1989; Querol y Barrio, 1990). Sin embargo, Querol y colaboradores (1992a) desarrollaron un método de análisis del mtDNA que evita la utilización de gradientes en cloruro de cesio y el uso de una ultracentrífuga, factor limitante para su utilización en la industria. La simplificación de la técnica se basa en el hecho de que los enzimas del tipo GCAT utilizados para digerir el DNA total, no reconocen las secuencias ricas en GC ni ricas en AT del mtDNA. Por tanto, dado el bajo número de puntos de corte en el mtDNA, este da lugar a fragmentos de mayor tamaño que se puede visualizar claramente como bandas definidas, por encima de los fragmentos degradados del DNA nuclear. No todos los enzimas revelan el mismo grado de polimorfismo y es muy dependiente de la especie. En el caso concreto de *S.*

cerevisiae los enzimas más apropiados para diferenciar a nivel de cepa son *HinfI* y *HaeIII* (Guillamón y col., 1994). La utilización del análisis de restricción no queda restringida a *Saccharomyces* (Querol y col., 1992b), ya que ha sido aplicada con gran éxito a otras especies de levaduras: *C. zeylanoides* y *D. hansenii* (Romano y col., 1996; Su y Meyer, 1991), *Dekkera/Brettanomyces* (Ibeas y col., 1996), *Kluyveromyces* (Belloch y col., 1997) y *Zygosaccharomyces* (Esteve-Zarzoso y col., 2003; Guillamón y col., 1997). Su aplicación en levaduras asociadas a alimentos durante los últimos 5 años, se refleja en la Tabla 5.

Esta técnica rápida permite el análisis de un mayor número de cepas en menos tiempo, y resulta ideal para la utilización en la industria por su rapidez, seguridad y economía y por no requerir material sofisticado, ni personal muy especializado.

2.2.3. Métodos basados en la técnica de PCR.

Las técnicas moleculares más rápidas son las basadas en la técnica de PCR (Saiki y col., 1988) y han sido utilizadas para discriminar cepas dentro de una especie de levadura. El desarrollo de algunas variantes en la técnica de PCR básica, puede ser aprovechado para detectar polimorfismos de fragmentos de DNA sin necesidad de utilizar enzimas de restricción. Las técnicas más utilizadas para la diferenciación de levaduras a nivel de cepa son RAPD y microsatélites. Otras técnicas, como la amplificación de secuencias δ , han sido desarrolladas específicamente para la diferenciación de cepas vínicas de la especie *S. cerevisiae*.

A continuación se describen cada una de estas técnicas.

2.2.3.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

La técnica de RAPD (Williams y col., 1990), se caracteriza porque utiliza un único cebador el cual presenta como características especiales una corta longitud (aproximadamente de 10 nucleótidos) y una secuencia arbitraria. La reacción de RAPDs-PCR también se caracteriza por la baja temperatura de hibridación utilizada (37°C). La corta y arbitraria secuencia del oligonucleótido, junto con la baja temperatura empleada, determinan el apareamiento entre oligonucleótido y el DNA, iniciándose la amplificación de diversos fragmentos de DNA distribuidos a lo largo de todo el genoma. El resultado es un patrón de productos amplificados de diferente peso molecular, que puede ser característico de la especie o bien de las diferentes cepas o aislados de una misma especie (Bruns y col., 1991; Paffetti y col., 1995).

La principal ventaja del método es que no se necesita información previa sobre la secuencia para el diseño del cebador. Además, la técnica permite analizar la variabilidad a lo largo de todo el genoma revelando más polimorfismo que otras técnicas que analizan zonas concretas. Sin embargo, debido a la baja temperatura de hibridación utilizada (37°C) los perfiles de amplificación obtenidos son poco reproducibles siendo necesario llevar a cabo varias repeticiones para cada muestra partiendo de distintas extracciones de DNA. Sólo se tendrán en cuenta las bandas presentes en todas las repeticiones, por lo que es recomendable combinar los resultados de la amplificación con varios oligonucleótidos para conseguir un buen poder de resolución.

A pesar de esto, ha sido aplicada para la caracterización de levaduras asociadas a alimentos, como en el caso de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de vino y cerveza alterados (Baleiras Couto y col., 1996a) o cepas de *D. bruxellensis* aisladas de vino (Mitrakul y col., 1999), siendo también utilizado con fines taxonómicos (Fernández-Espinar y col., 2003; Molnar y col., 1995). Además, esta técnica ha permitido la discriminación a nivel de especie de aislados de levadura a partir de quesos (Prillinger y col., 1999). Baleiras Couto y colaboradores (1995) aplicaron RAPDs para la identificación de especies alterantes como *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *S. cerevisiae*, *Candida valida* y *C. lipolytica*.

2.2.3.2. PCR de zonas repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites).

Existen zonas repetidas en el genoma que representan dianas potenciales para la identificación molecular a nivel de cepa por mostrar mucha variabilidad. Estas zonas son los microsatélites y los minisatélites, de longitud muy variable que se repiten en tándem y al azar a lo largo del genoma. Los microsatélites tienen una longitud normalmente inferior a 10 pb mientras que los minisatélites tienen una longitud entre 10 y 100 pb. Los productos de amplificación generados presentan tamaños comprendidos entre 700 y 3500 pb aproximadamente, por lo que se pueden visualizar en geles de agarosa.

La variabilidad presentada por estas zonas puede determinarse mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos como (GTG)₅, (GAG)₅, (GACA)₄ o M13. Mediante estos oligonucleótidos, Lieckfeldt y colaboradores (1993) revelaron el polimorfismo entre cepas de *S. cerevisiae*. Estos mismos autores fueron los primeros en utilizar estas secuencias como cebadores en una reacción de PCR mostrando su utilidad como técnica de caracterización a nivel de cepa. La técnica fue utilizada posteriormente por otros autores para la caracterización de cepas de levadura aisladas de cerveza (Laidlaw y col., 1996) y vino (Quesada y Cenis, 1995), así como

diferentes aislados de levaduras alterantes. Baleiras Couto y colaboradores (1995, 1996a) aplicaron la técnica con éxito para la caracterización de cepas de *S. cerevisiae* alterantes de bebidas alcohólicas. Aunque es una técnica que se ha aplicado para la caracterización intraespecífica de levaduras, también se ha utilizado para la identificación a nivel de especie. Así, Baleiras Couto y colaboradores (1996b) identificaron cepas de *Z. bailii* y *Z. bisporus* presentes en mayonesa y aliños de ensalada. Otros trabajos más recientes se describen en la Tabla 5.

2.2.3.3. Amplificación de secuencias δ .

Las secuencias delta son elementos de 0,3 kb que flanquean los retrotransposones Ty1 (Cameron y col., 1979). En el genoma de levadura están presentes cerca de 100 copias de delta como parte de retrotransposones Ty1 o como elementos aislados. Sin embargo estas secuencias delta están concentradas en regiones genómicas contiguas a los genes tRNA (Eigel y Feldmann, 1982). El número y la localización de estos elementos posee una cierta variabilidad intraespecífica, que fue aprovechada por Ness y colaboradores (1993) para desarrollar cebadores específicos (δ_1 y δ_2) útiles para diferenciar cepas de *S. cerevisiae*. Estos autores muestran que la estabilidad de los elementos δ es suficiente para aplicar esta técnica como método de identificación de cepas de *S. cerevisiae* a nivel industrial, como mostraron posteriormente numerosos autores. Algunos de estos trabajos muestran la gran variabilidad que revela esta técnica entre aislados de la especie *S. cerevisiae* con respecto a otras técnicas muy resolutivas como el análisis de restricción del mtDNA y la electroforesis de cromosomas (Fernández-Espinar y col., 2001; Pramateftaki y col., 2000).

Recientemente, Legras y Karst (2003) optimizaron la técnica mediante el diseño de dos nuevos cebadores (δ_{12} y δ_{21}) que se localizan muy próximos a δ_1 y δ_2 . Su uso combinado revela un mayor polimorfismo que se refleja con la aparición de un mayor número de bandas. Schuller y colaboradores (2004) lo confirmaron posteriormente mostrando que la combinación de δ_2 y δ_{12} identificaba el doble de cepas que el juego de cebadores diseñado por Ness y colaboradores (1993).

Un inconveniente importante que puede presentar esta técnica es la influencia de la concentración de DNA en el perfil obtenido (Fernández-Espinar y col., 2001; Schuller y col., 2004). Aunque este problema se evita estandarizando la concentración de DNA, la comparación de resultados entre laboratorios resulta complicada. Otro problema que presenta la técnica es la aparición de bandas inespecíficas debido a la baja temperatura de hibridación (42°C) utilizada durante la reacción de amplificación. Recientemente, Ciani

Introducción

y colaboradores (2004) emplearon una temperatura de anillamiento de 55°C para la caracterización de cepas vínicas de *S. cerevisiae*. De esta manera se obtienen perfiles de amplificación mucho más estables, aunque con menor número de bandas. Como se aprecia en la Tabla 5, los trabajos recientes que utilizan esta técnica para caracterización de levaduras asociadas a alimentos, se han centrado únicamente en la especie *S. cerevisiae*.

2.2.3.4. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

AFLP es una técnica basada en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de una digestión total de DNA. Los fragmentos son separados en geles de acrilamida visualizados por auto-radiografía o en equipos de secuenciación automáticos (Vos y col., 1995).

Al igual que en el caso de RAPDs, no se necesita información previa sobre la secuencia para el diseño del cebador, es muy reproducible y aporta una gran cantidad de información. AFLP es una técnica útil para discriminar levaduras a nivel de cepa como mostraron de Barros Lopes y colaboradores (1999). Sin embargo presenta el inconveniente de ser una técnica muy laboriosa, ya que requiere secuenciadores automáticos y material muy sofisticado, y difícil interpretación de los datos. Aunque la técnica ha sido muy utilizada para el estudio de bacterias, plantas y animales, en el caso de las levaduras son pocos los trabajos al respecto (Boekhout y col., 2001; Borst y col., 2003; Dassanayake y Samaranayake, 2003; Theelen y col., 2001; Trilles y col., 2003). Además, estos trabajos no abordan el estudio de levaduras asociadas a alimentos. Recientemente, Azumi y Goto-Yamamoto (2001) utilizaron nueve oligonucleótidos para caracterizar y agrupar levaduras industriales, aisladas de bebidas alcohólicas y productos de panadería, pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto* (Tabla 5).

Tabla 5. Técnicas moleculares más frecuentemente utilizadas para la caracterización de cepas de levadura de alimentos y bebidas, y su aplicación en los últimos 5 años.

Técnica	Especies diana	Matriz alimentaria	Referencias (de 2000 a 2005)
Electroforesis de cromosomas	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida zeylanoides</i>	Aves	Deak y col., 2000
	<i>S. bayanus</i>	Vino	Naumov y col., 2000
	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i>	Cerveza	Jespersen y col., 2000
	<i>S. cerevisiae</i>	Cachaca	Guerra y col., 2001
	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i>	Sidra	Naumov y col., 2001
	<i>S. bayanus</i>	Vino	Naumov y col., 2002
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Martínez y col., 2004
	<i>S. cerevisiae</i> / <i>no-Saccharomyces</i> ^(a)	Uvas y vino	Rodríguez y col., 2004
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Quesos	Petersen y Jespersen, 2004
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Valero y col., 2005
<i>S. cerevisiae</i> / <i>no-Saccharomyces</i> ^(b)	Cacao fermentado	Jespersen y col., 2005	
RFLP mtDNA	<i>S. cerevisiae</i> / <i>no-Saccharomyces</i> ^(c)	Vino	Pramateftaki y col., 2000
	<i>S. cerevisiae</i> , <i>K. Marxianus</i> , <i>K. lactis</i>	Queso	Suzzi y col., 2000
	<i>S. cerevisiae</i>	Mosto y vino	Fernández-González y col., 2001
	<i>D. hansenii</i>	Queso	Petersen y col., 2002
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Granchi y col., 2003
	<i>S. cerevisiae</i>	Mosto	Cappello y col., 2004
	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Candida humilis</i>	Masa de pan	Foschino y col., 2004
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Martínez y col., 2004
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Valero y col., 2005
	PCR-RAPD	<i>Y. lipolytica</i> , <i>C. zeylanoides</i>	Aves
<i>Y. lipolytica</i>		Salchichas	Gardini y col., 2001
<i>S. cerevisiae</i>		Cachaca	Guerra y col., 2001
<i>Geotrichum candidum</i>		Queso	Marcellino y col., 2001
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		Cachaca	Gomes y col., 2002
<i>S. cerevisiae</i>		Masa de pan	Suzzi y col., 2003
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>D. hansenii</i>		Productos lácteos	Vasdinyei y Deak, 2003
<i>No-Saccharomyces</i> ^(d)		Queso	Fadda y col., 2004
<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. humilis</i>		Masa de pan	Foschino y col., 2004
<i>Pichia galeiformis</i>		Zumo de naranja	Pina y col., 2005
Micro y minisatélites	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Kloeckera apiculata</i>	Vino	Caruso y col., 2002
	<i>S. cerevisiae</i>	Cerveza	Naumova y col., 2003
	<i>Candida stellata</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>S. pombe</i>	Vino	Capece <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Howell y col., 2004
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Valero y col., 2005
	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Legras y col., 2005
	<i>P. galeiformis</i>	Zumo de naranja	Pina y col., 2005

Introducción

Continuación Tabla 5

Técnica	Especies diana	Matriz alimentaria	Referencias (de 2000 a 2005)
δ PCR	<i>S. cerevisiae</i>	Vino	Pramateftaki y col., 2000 Lopes y col., 2002
		Mosto	Cappello y col., 2004
		Masa de pan	Pulvirenti y col., 2004
AFLP	<i>Saccharomyces sensu stricto</i> ^(e)	Bebidas alcohólicas, productos panadería.	Azumi y Goto-Yamamoto, 2001

^(a) *Candida guilliermondii*, *C. pulcherrima* y *Kloeckera apiculata*. ^(b) *C. krusei*, *Hansenula guilliermondii*, *Pichia membranefaciens* y *Saccharomyces kluyveri* ^(c) *C. stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Torulasporea delbruckii* ^(d) *C. lambica*, *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *Geotrichum candidum* y *Kluyveromyces lactis* ^(e) *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. carlsbergensis*, *S. paradoxus*, y *S. pastorianus*.

3. Técnicas cuantificación de levaduras alterantes de alimentos.

La determinación del grado de contaminación por levaduras en los alimentos y bebidas procesadas es esencial para asegurar la calidad del producto final. Por tanto, resulta imprescindible conocer el número de levaduras, tanto beneficiosas como alterantes, asociadas a bebidas y alimentos fermentados (Deák y Beuchat, 1996).

Tradicionalmente se han utilizado los métodos de recuento en placa para la detección y enumeración de levaduras. El medio ideal debería impedir el crecimiento de hongos filamentosos y bacterias, permitiendo el crecimiento de aquella levadura o grupo de levaduras que tengan relevancia en un alimento o bebida particular. Aunque no existe el medio ideal, en la literatura se describen una serie de medios que han permitido a la industria alimentaria monitorizar las levaduras en un amplio rango de alimentos (Barnett y col., 1990; Beuchat y Hocking, 1990; Davenport, 1980a; Fung y Liang, 1990; Kreger van Rij, 1984; Pitt y Hocking, 1985).

A continuación se describen con más detalle los métodos de recuento tradicionales, así como las nuevas técnicas que permiten la detección y enumeración de levaduras alterantes en la industria alimentaria.

3.1. Métodos convencionales de enumeración de levaduras (Recuento en placa).

En el método de recuento en placa existe una serie de procedimientos a tener en cuenta que incluyen la toma de la muestra, las técnicas de pre-tratamiento de la muestra (maceración, selección del diluyente, enriquecimiento) y selección del medio de aislamiento.

3.1.1. Técnicas de pre-tratamiento.

Cualquier muestra alimentaria debe homogeneizarse utilizando el diluyente adecuado en función del microorganismo que se desea aislar. A modo de ejemplo, el aislamiento y recuento de levaduras osmotolerantes como *Z. rouxii*, requiere diluyentes con elevado contenido en solutos, como la glucosa o el glicerol, para obtener una a_w similar a la del alimento de origen (Hernández y Beuchat, 1995). De esta manera se consigue un efecto protector frente al estrés osmótico.

Los métodos de enriquecimiento se utilizan comúnmente para detectar bacterias patógenas en alimentos. Sin embargo, algunos autores han sugerido el enriquecimiento de cultivos para detectar especies de levaduras. Así, ya que las levaduras alterantes pueden estar presentes en los alimentos a muy bajos niveles, el enriquecimiento podría suponer una mejora de su detección (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Además, el enriquecimiento puede ser muy útil para el crecimiento y selección de levaduras alterantes que se encuentran en estado subletal debido a procesos térmicos, osmóticos o químicos (Thomas y Ackerman, 1988).

3.1.2. Medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Para la industria alimentaria, resulta interesante determinar el número de ciertas especies de levaduras, aisladas de alimentos específicos. Además, la mayoría de levaduras inoñas crecen rápidamente, inhibiendo el crecimiento lento de las levaduras alterantes. Por tanto, resulta interesante utilizar medios selectivos y diferenciales que favorezcan el crecimiento específico de levaduras alterantes directamente en la placa empleada para su aislamiento.

Algunas estrategias para desarrollar medios selectivos y diferenciales de levaduras alterantes, se basan en formulaciones descritas por Phaff y colaboradores (1978) o Davenport (1980a). Existen varios tipos de medios en función del tipo de levaduras que

Introducción

se pretenda aislar y enumerar: levaduras resistentes a ácido, levaduras osmofílicas, etc. Así, de forma tradicional se han utilizado medios acidificados, como agar patata dextrosa (pH 3,5) o agar extracto de malta (MEA) (pH 4,8), que inhiben el crecimiento bacteriano. Estos medios no permiten el crecimiento de levaduras con estructura o metabolismo afectado, permitiendo además el crecimiento de bacterias de ácido láctico. Alternativamente se ha aplicado el uso de antibióticos, como cloramfenicol, oxitetraciclina o gentamicina, que mejora el aislamiento de levaduras (Beuchat, 1993).

El aislamiento de levaduras osmofílicas se basa en la utilización de suplementos de glucosa, fructosa, sacarosa o glicerol. A modo de ejemplo, el medio agar DG18 (a_w 0,95) es el único comercial (Hocking y Pitt, 1980), mientras que el agar extracto de malta-extracto de levadura-glucosa (MYG) fue desarrollado por Pitt y Hocking (1985) para el aislamiento de hongos osmotolerantes y osmofílicos, incluyendo levaduras. Se han desarrollado estrategias similares de adición de agentes selectivos para aislar levaduras de bebidas alcohólicas. Por ejemplo, el agar lisina selecciona únicamente aquellas levaduras contaminantes de bebidas que pueden utilizar la lisina como única fuente de nitrógeno. Otros utilizados son el agar diferencial Schwarz (SDM), que contiene una mezcla de fucsina y sulfito, o el medio ESY, que contiene extracto de levadura, etanol y sulfito para seleccionar el crecimiento de levaduras *Saccharomyces* (Deák y Beuchat, 1996). El medio BSM (Millipore) permite seleccionar levaduras del género *Dekkera spp*, aunque resultados prácticos con este medio han demostrado la posibilidad de crecimiento de otras especies que pueden confundirse con *Dekkera* (Stender y col., 2001).

Otras aproximaciones se basan en la detección de características enzimáticas particulares, gracias a la adición de compuestos cromogénicos o fluorogénicos en el medio. Algunos de los medios cromogénicos diseñados para la detección y enumeración de levaduras contaminantes de alimentos se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Medios de cultivo cromogénicos desarrollados recientemente para la diferenciación y enumeración de levaduras alterantes de alimentos.

Medio	Especie diana	Características diferenciales	Alimento	Referencia
YLM	<i>Y. lipolytica</i>	Decoloración marrón del agar que contiene tirosina	Quesos	Carreira y Loureiro, 1998
KDM	<i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>K. lactis</i>	Colonias azules por presencia de β -galactosidasa	Productos lácteos	Valderrama y col., 1999
ZDM	<i>Z. bailii</i>	Colonias azules en presencia de glucosa y ácido fórmico	vino	Schuller y col., 2000
	<i>D. hansenii</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>P. anomala</i>	Colonias salmón y azul oscuro por actividad β -glucosidasa y β -galactosidasa	Alimentos de a_w intermedia (IMF)	de Siloniz y col., 2000
DBDM	<i>Dekkera/Brettanomyces</i>	Colonias amarillo-verdosas, utilización ácido p-coumárico, resistencia cicloheximida, olor fenólico	Vino, refrescos	Rodríguez y col., 2001b
CHROM	<i>Candida</i> spp ^(a)	Colonias de distintos colores según especie	Ensaladas	Tornai-Lehoczki y col., 2003
DDM	<i>D. hansenii</i> ^(b)	Colonias violeta por actividad β -glucuronidasa	Carnes, quesos	Quirós y col., 2005

^(a) El CHROM agar fue inicialmente desarrollado para la detección de levaduras de interés clínico, como *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. (Odds y Bernaerts, 1994). ^(b) Permite diferenciar la especie *D. hansenii* de otras especies como *C. rugosa*, *I. orientalis*, *P. membranaefaciens*, *R. mucilaginoso* y *Z. bailii*.

3.2. Métodos rápidos de enumeración de levaduras.

La técnica de recuento en placa para la detección y enumeración de levaduras resulta sencilla, sin embargo, presenta una serie de inconvenientes, entre los cuales destaca su laboriosidad, así como su baja reproducibilidad. Otro aspecto importante es que la formación de colonias a menudo procede de agregados de células, dando lugar a errores importantes en el recuento. Además, el crecimiento lento de las levaduras asociadas a alimentos limita el uso de esta técnica, ya que se precisan largos periodos de incubación.

Por tanto, la detección y cuantificación de células viables, directa o indirectamente, debe realizarse mediante métodos rápidos, precisos, sensibles y reproducibles.

Introducción

A continuación se detallan algunos de los métodos rápidos desarrollados recientemente.

3.2.1. PCR a tiempo real.

La PCR a tiempo real es una técnica de reciente desarrollo y representa un avance significativo en el desarrollo de técnicas moleculares basadas en ácidos nucleicos. Como se detalla en el punto 2.1.3 de la introducción, esta técnica permite la monitorización de la síntesis de nuevos fragmentos durante la PCR mediante fluorescencia (Heid y col., 1996). Entre las ventajas de la PCR a tiempo real, destaca la posibilidad de cuantificar cantidades iniciales de ácidos nucleicos en un amplio rango de cuantificación (más de ocho órdenes de magnitud), relacionándose con una determinada cantidad de células. Esta característica junto con su rapidez y sensibilidad, la han convertido en una buena alternativa frente a otros métodos de detección y enumeración de levaduras asociadas a alimentos.

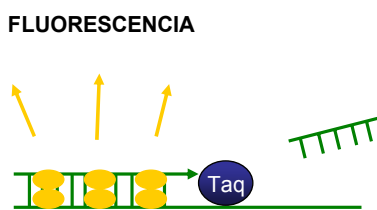
3.2.1.1. *Formatos para la detección del amplificado.*

A través de estrategias de detección inespecífica, la fluorescencia puede ser producida utilizando agentes intercalantes de DNA. Hasta el momento, se han utilizado el bromuro de etidio (Higuchi y col., 1993) o el YO-PRO-1 (Tseng y col., 1997). Sin embargo, el más utilizado es el SYBR Green I, el cual se une al DNA de doble cadena produciendo un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR durante la fase de elongación (Figura 3a). Recientemente, se ha descrito una nueva molécula intercalante, BEBO, de características similares al SYBR-Green I (Bengtsson y col., 2003).

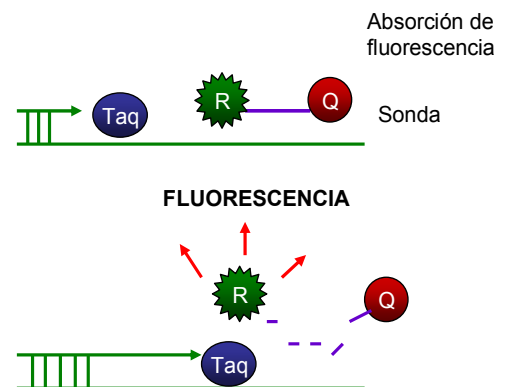
La detección específica de fluorescencia se lleva a cabo mediante sondas fluorescentes, que se agrupan principalmente en dos tipos: sondas de hidrólisis y sondas de hibridación (Figura 3). La sonda de hidrólisis más utilizada es la llamada sonda Taqman y se caracteriza por tener unidos un fotocromo emisor de fluorescencia ("Reporter") y un fotocromo que absorbe fluorescencia ("Quencher") (Figura 3b). Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el donador no emite señal. Pero, cuando la sonda se une a la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la *Taq* polimerasa activa al fotocromo emisor de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente. La señal fluorescente del donador acumulada en los sucesivos ciclos de PCR se va monitorizando. A diferencia de las sondas de hidrólisis, la

fluorescencia generada por las sondas de hibridación se produce por un cambio en su estructura secundaria durante la fase de hibridación, lo que resulta en un incremento de la distancia que separa el donador y el receptor. Las sondas más relevantes en este formato son las sondas en bucle y las FRET (Figura 3c y 3d). Las sondas con forma de bucle (Molecular Beacons, Scorpion primers) poseen secuencias repetidas invertidas (ITR) en sus extremos 5' y 3'. Este diseño permite que se forme una estructura de bucle por complementariedad de las dos regiones ITR, en ausencia de la secuencia diana. Cuando la sonda se une al ADN diana, se produce una separación de los fluorocromos, que da lugar a la emisión de fluorescencia. Por último, las sondas de hibridación FRET consisten en dos sondas, donador (D) y aceptor (A), de unión a la región a amplificar, con distinto marcaje fluorescente. La transferencia de energía de resonancia sólo ocurre cuando ambas sondas se unen al ADN diana muy próximas entre sí (entre 1-5 nucleótidos de distancia).

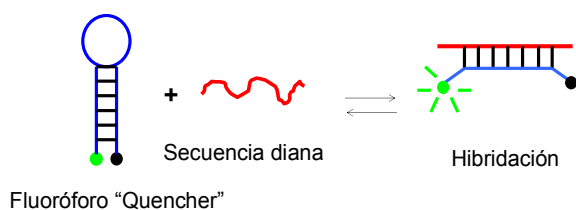
a) SYBR-Green



b) Sondas de hidrólisis: sondas TaqMan



c) Sondas en bucle : Molecular beacon



d) Sondas de hibridación: FRET

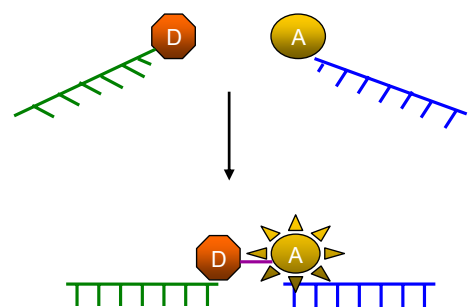


Figura 3. Sistemas de detección en PCR a tiempo real.

Todos estos sistemas de fluorescencia tienen ventajas e inconvenientes que determinarán su elección. Por ejemplo, si se quiere un sistema simple, económico y fácil de usar se elegirá SYBR green. Sin embargo, durante la reacción de PCR éste se puede unir a dímeros de cebadores y a otros productos inespecíficos resultando en una sobreestimación de la concentración de DNA diana (Halford, 1999; Halford y col., 1999). Si se desea una mayor especificidad se recurrirá al sistema con sondas. Además, en el caso de las sondas FRET, el uso de dos sondas independientes resulta en una máxima especificidad y flexibilidad en el diseño de la sonda. Al no producirse hidrólisis de las sondas, la fluorescencia es reversible, lo que permite la generación de curvas de disociación. Recientemente, el uso simultáneo de varias sondas fluorogénicas ha permitido la discriminación de múltiples amplicones (PCR multiplex a tiempo real). Sin embargo, el número de fluoróforos disponibles es muy limitado, y normalmente se utiliza una fuente de luz monocromática, por lo que la técnica no está muy extendida.

3.2.1.2. Diseño del ensayo de PCR a tiempo real.

Uno de los parámetros más importantes en el diseño de un ensayo de PCR a tiempo real es el tamaño del amplificado y la temperatura de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos y/o sondas a utilizar. El tamaño óptimo del fragmento a amplificar debe ser de 150 pb, sin embargo fragmentos de 300 pb amplifican eficientemente. Esto es debido a que los fragmentos cortos son mejor desnaturalizados durante la PCR, permitiendo a los oligonucleótidos y sondas competir más eficientemente por la unión a sus secuencias diana. Además, los tiempos de polimerización serán más cortos, por lo que se reduce la formación de artefactos y la duración del ensayo. La T_m de las sondas es también un parámetro crítico. Como los oligonucleótidos se extienden tan pronto se unen a su diana, la secuencia diana de hibridación queda enmascarada rápidamente por nuevo DNA sintetizado. Por tanto, es recomendable utilizar sondas con una T_m mayor (unos 10 °C) que la de los oligonucleótidos.

Existen programas informáticos que permiten el diseño de cebadores y sondas adecuados para las condiciones de PCR a tiempo real. Normalmente el diseño se aborda a partir de datos de secuencia de genes o regiones que han resultado útiles para establecer relaciones filogenéticas entre especies, y que además poseen la ventaja de ser fácilmente obtenibles a través de Internet. Estas secuencias son las correspondientes a la región ribosómica D1/D2 (Kurtzman y Robnett, 1998), al gen mitocondrial COX2 (Belloch y col., 2000; Kurtzman y Robnett, 2003) y al gen nuclear de la actina (Daniel y

Meyer, 2003). En algunas ocasiones, las divergencias nucleotídicas encontradas para estas secuencias entre algunas especies no son suficientes para el diseño de los cebadores y habrá que recurrir a marcadores moleculares que revelen mayor variabilidad.

3.2.1.3. Análisis de cuantificación.

Como se ha comentado anteriormente, la fluorescencia emitida por los fluoróforos puede ser visualizada como una curva de amplificación, que presenta diferentes fases. La fase de iniciación ocurre durante los primeros ciclos, donde la fluorescencia emitida no puede distinguirse de la basal (Figura 4). Durante la fase exponencial o logarítmica, hay un incremento exponencial de fluorescencia antes de alcanzar la fase “plateau” (donde ya se han consumido los reactivos y no se observa incremento de fluorescencia). La cuantificación sólo es posible durante la fase exponencial. La cantidad de DNA al inicio de la PCR puede determinarse mediante la interpolación del valor de C_t (“threshold cycle”) en una curva estándar lineal de valores de C_t , construida a partir de diluciones seriadas de DNA de concentraciones conocidas. Esta curva estándar correlaciona valores de fluorescencia emitida (C_t) con la concentración inicial de los estándares utilizados. El resultado se obtiene por la interpolación en la curva estándar de la fluorescencia producida durante la amplificación de la muestra.

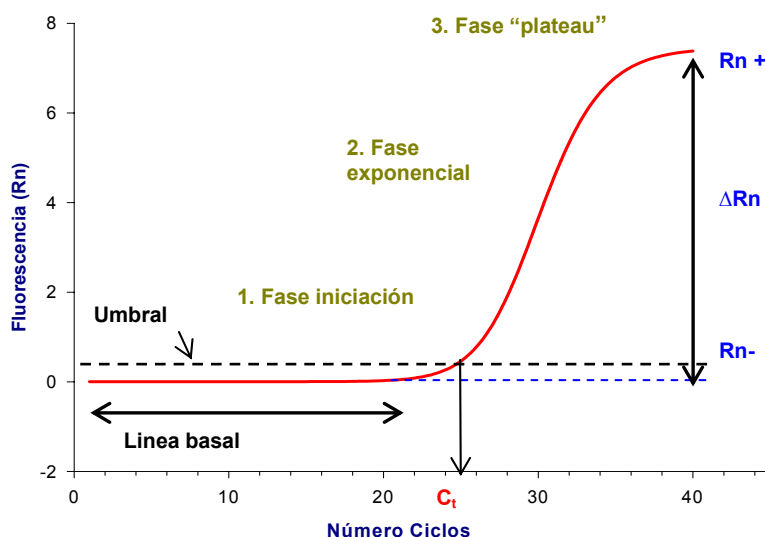


Figura 4. Modelo de curva de amplificación, mostrando los términos utilizados habitualmente en PCR cuantitativa.

3.2.2. Otras técnicas rápidas de enumeración de levaduras.

Existe un conjunto de métodos que, basados en las técnicas convencionales, permiten acelerar el procedimiento mediante automatización. A modo de ejemplo están Petrifilm, Redigel y SimPlate, cuya eficiencia es similar a la obtenida mediante recuento en placa (Beuchat y col., 1998).

Aunque los métodos anteriores dependen todavía del paso de obtención del cultivo, existen otros que no lo requieren. Es el caso de la microscopía de epifluorescencia y la citometría de flujo (de Boer y Beumer, 1999; Veal y col., 2000). La epifluorescencia es una técnica que se basa en el filtrado de la muestra pre-tratada, la tinción de las células en membrana con naranja de acridina y el recuento de las células por microscopía epifluorescente. Ha sido utilizada para enumerar levaduras aisladas de zumos, yogurt, vino y cerveza, y se describe como un método muy rápido (menos de 30 minutos) y sensible (Cootes y Johnson, 1980). Sin embargo, en ocasiones se requieren largas preincubaciones de la muestras, y no permite diferenciar células viables de no viables (Rodríguez y Kroll, 1986).

Una técnica relativamente reciente es la citometría de flujo, que permite un rápido recuento de los microorganismos. Esta técnica se basa en la dispersión de luz por parte de las células y el uso de uniones fluorescentes para facilitar la discriminación de microorganismos del material de fondo (Veal y col., 2000). Sus principales ventajas son la objetividad y rapidez, permitiendo detectar células viables. Los resultados obtenidos en trabajos previos muestran una buena correlación con el recuento en placa, aunque una baja sensibilidad, siendo necesarios pasos de enriquecimiento selectivo (Jespersen y col., 1993).

El número más probable (NMP) es una técnica clásica muy utilizada para estimar la carga microbiana de un alimento (Harrigan, 1998). Se usa con frecuencia en alimentos sólidos, aunque también se ha descrito su uso en vinos (Rodríguez y col., 2001b). Si además, se utilizan medios selectivos, resulta muy útil para enumerar levaduras alterantes fermentativas.

La hibridación fluorescente in situ (FISH) utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA. La técnica consiste en preparar sondas complementarias de las secuencias de DNA que se quieren examinar. Estas sondas se "marcan" con moléculas fluorescentes (por ejemplo biotina o fluoresceína) y posteriormente se hibridan o unen al DNA complementario permitiendo localizar las secuencias específicas. Aunque esta técnica se ha aplicado fundamentalmente para la

detección y enumeración de especies de interés clínico como *Candida spp* (Oliveira y col., 2001; Rigby y col., 2002), se ha utilizado también para detección de levaduras alterantes de vino, como *D. bruxellensis* (Connel y col., 2002; Stender y col., 2001).

Las técnicas inmunológicas destacan por su especificidad y sensibilidad. Aunque se han desarrollado varias metodologías para la detección de hongos en alimentos, como inmunofluorescencia o ELISA, su aplicación a levaduras no ha resultado exitosa. Así, algunas levaduras producen antígenos termoestables, útiles para la detección. Sin embargo, las condiciones de crecimiento influyen en la cantidad de antígenos extracelulares producidos por las levaduras. Además, los anticuerpos utilizados detectan tanto células viables como células muertas. Por tanto, aunque en algunos casos puede utilizarse como método alternativo, en general la aplicación de inmunoensayos basados en la detección de antígenos extracelulares de levadura no se ha desarrollado con éxito (Middelhoven y Notermans, 1993).

Finalmente cabe destacar la técnica de NASBA, descrita anteriormente, que además de ser útil como método de identificación, puede utilizarse para la cuantificación de microorganismos, gracias a la introducción de “molecular beacons”. Existen diversos trabajos que utilizan este método como estrategia de cuantificación, sin embargo la mayoría están centrados en virus, sin que se conozca, hasta el momento, aplicación a levaduras.

4. Aplicaciones.

4.1. Estudio de la diversidad de levaduras en alimentos.

Según el concepto ecológico en microbiología de alimentos, el alimento puede ser considerado como un buen hábitat para el crecimiento de los microorganismos. El origen, desarrollo y sucesión de tales microorganismos dependería de factores ecológicos que influyen en la expresión fisiológica de las células (Deák y Beuchat, 1996). En el caso de las levaduras alterantes, existe una gran cantidad de levaduras aisladas de diferentes alimentos, las cuales podrían estar o no correctamente identificadas, y estar o no implicadas en la alteración del alimento. Existen pocos estudios sobre el origen de tales levaduras, la ecología de estas levaduras en el ambiente natural, y en la industria de producción del alimento. Por tanto, resulta de gran interés conocer la respuesta de las levaduras a factores intrínsecos y extrínsecos del ambiente del alimento, ya que esto determinará la posible alteración del mismo.

Introducción

Habitualmente, existe una clara correlación entre el número de levaduras, la especie y el tipo de alimento que colonizan. Muchas levaduras están asociadas a plantas y animales, por lo que podrán encontrarse en los alimentos posteriormente procesados. Algunas asociaciones son muy específicas, pudiendo determinarse diferencias de comunidades de levaduras entre diferentes tipos de alimentos (Deák y Beuchat, 1996). El estudio de la cantidad y tipo de levaduras que coloniza un ingrediente o alimento en particular, junto con la frecuencia y distribución de estas especies, permitirá establecer las estrategias ecológicas para prevenir la alteración de alimentos causada por levaduras.

El continuo desarrollo de herramientas moleculares para una rápida identificación de los microorganismos, ha facilitado los estudios de diversidad de levaduras en el hábitat del alimento. Las técnicas de identificación de levaduras basadas en biología molecular, descritas en el apartado 2.1, han permitido determinar las especies de levaduras asociadas a alimentos específicos, demostrando no sólo su papel beneficioso (al participar en procesos fermentativos), sino también su potencial como alterantes. Existen diversos trabajos centrados en el estudio de las poblaciones de levaduras en diversos alimentos, algunos de los cuales se detallan en la Tabla 2 y 4. Estos estudios han sido de gran utilidad para evaluar la precisión y aplicabilidad de las distintas técnicas de identificación de levaduras, antes mencionadas. Así, a modo de ejemplo, Foschino y colaboradores (2004) realizaron una comparación entre técnicas de cultivo y técnicas moleculares para identificar las levaduras presentes en masa de pan, revelando la presencia de levaduras pertenecientes a *C. humilis* y *Saccharomyces sensu stricto*. Meroth y colaboradores (2003) determinaron en masa de pan una amplia variedad de levaduras que no se habían descrito previamente, como *Saccharomyces servazii*, *S. uvarum* y *D. bruxellensis*.

La presencia de levaduras en bebidas alcohólicas ha sido ampliamente estudiada. Existen numerosos trabajos que describen las levaduras presentes en vinos, la mayoría centrados en la diversidad presente en la uva, durante las distintas fases de fermentación del mosto, en la botella o en el ambiente de la bodega (Deák y Beuchat, 1996). Se han descrito enormes variaciones en el tipo y cantidad de especies de levaduras en el mosto, en función de la variación en los ecosistemas (por tratarse de distinta bodega o distintas áreas geográficas). Otras bebidas alcohólicas, como sidra y cerveza, también han sido estudiadas desde el punto de vista de diversidad de levaduras, ya que éstas pueden tener un papel importante como alterantes. Algunos de los trabajos de reciente publicación se describen en la Tabla 4.

En el caso de productos lácteos, las levaduras tienen un papel importante no sólo en la fermentación sino también en la maduración de determinados quesos. Los alimentos lácteos suponen un nicho ecológico especial que selecciona la presencia y actividad de especies de levaduras determinadas, como aquellas que asimilan y fermentan la lactosa o que tienen actividad proteolítica y lipolítica (Deák y Beuchat, 1996). Existen numerosos trabajos que demuestran la diversidad de levaduras en lácteos, como leche, yogurt y quesos, y en los que queda demostrado el papel de las levaduras como alterantes. Entre los trabajos más recientes, Cappa y Cocconcelli (2001) identificaron la presencia de la especie *Z. microellipsoides* en yogurt y queso (Tabla 4). El papel de *Pichia anomala* como alterante de yogurt también quedó demostrado por Caggia y colaboradores (2001). Además, el estudio de la diversidad de levaduras en quesos, ha permitido evaluar su papel en las propiedades funcionales y sensoriales del producto (Romano y col., 2001).

Las levaduras forman una pequeña parte de la microflora natural de la carne. Su capacidad para crecer a bajas temperaturas, altas concentraciones de sal y poco oxígeno, les permite proliferar en productos cárnicos refrigerados, curados o envasados. Hay numerosos trabajos que han estudiado la presencia de levaduras en carnes, salchichas y aves. En dichos estudios, la aplicación de técnicas moleculares ha sido también muy útil para identificar la microbiota presente y estudiar los cambios físico-químicos durante la fermentación y maduración. Un ejemplo es el reciente trabajo de Rantsiou y colaboradores (2005), quienes determinaron la presencia de las especies *D. hansenii*, *Willopsis saturnus* y diversas especies de *Candida* en salchichas fermentadas, mediante la aplicación de métodos de cultivo y PCR-DGGE. En otros productos cárnicos, como las aves, se ha evidenciado la predominancia de las especies *Y. lipolytica* y *C. zeylanoides*, mediante RFLPs de la región 5,8S- ITS, sugiriendo el importante papel que pueden tener como alterantes de estos alimentos (Deák y col., 2000, Deák, 2001).

Además de la importancia que supone conocer las especies asociadas a distintos alimentos, resulta de gran interés conocer la diversidad genética de una determinada especie de levadura en el alimento. Las técnicas moleculares de tipificación se han utilizado recientemente con éxito para estudios de ecología de levaduras en alimentos (Tabla 5). Esto ha permitido realizar estimaciones de la diversidad genética, la posición taxonómica, o la relación geográfica entre distintos aislados de cerveza, vino, mostos y otras bebidas fermentadas (Briones y col., 1996; Guerra y col., 2001; Naumova y col., 2003; Martínez y col., 2004).

4.2. Estudio del origen de contaminación en la cadena de producción alimentaria.

La mayoría de levaduras alterantes (Tabla 1) están universalmente distribuidas, pudiendo producir los mismos efectos en distintos alimentos de diferentes áreas geográficas. Sólo algunas especies de reciente descripción (*Z. lentus*, *Z. kombuchaensis*) pueden tener hábitats únicos, o localizarse en regiones geográficas específicas. Por otra parte las levaduras alterantes muestran especial resistencia a factores como temperatura, azúcar, sal, etanol o conservantes (ácidos débiles), lo que condiciona que habiten de forma específica distintos alimentos. Sin embargo, cabe preguntarse si existen otros mecanismos específicos que conducen a la contaminación del alimento.

El estudio del ecosistema natural de la levadura, así como el hábitat relacionado con la producción y almacenamiento del alimento, resulta esencial para establecer las fuentes de infección de levaduras alterantes. Las frutas y hortalizas representan el mejor hábitat natural para algunas especies de levaduras, incluyendo las osmofílicas como *Z. bailii* y *Z. rouxii* (Tilbury 1980a, 1980b), por lo que se describen como un importante origen de contaminación. Los azúcares o jarabes también suponen una fuente de infección importante de levaduras osmofílicas (Schmidt, 1995). Además, el agua que forma parte de alimentos y bebidas o que se utiliza para la limpieza de maquinaria, puede suponer una fuente de levaduras (Schmidt, 1995). Por otra parte, aunque no es habitual que el aire suponga un origen de contaminación, puede ser motivo de contaminación por levaduras como *Rhodotorula* y *Sporidiobolomyces spp*, descritas como “levaduras de higiene” (Davenport, 1996). Los insectos, como moscas y abejas, actúan como vectores de la contaminación. Algunas de las especies que están asociadas a insectos son *D. hansenii*, *C. parapsilosis*, *P. membranaefaciens*, *S. cerevisiae*, *I. orientalis* y *S. ludwigii* (Lachance y col., 1995). Se ha descrito que algunos insectos, como las abejas, pueden transportar levaduras osmofílicas, incluyendo *Z. rouxii*. Recientemente se relacionó la contaminación de alimentos con alto contenido en azúcar con algunas especies de *Candida*, aisladas de distintos insectos (Lachance y col., 2001; Stratford y col., 2002). Por último, la utilización de equipos sucios o contaminados para la fabricación o procesado del alimento es probablemente la causa más común de infección por levaduras en la industria.

A modo de ejemplo se puede nombrar el caso concreto de la industria vinica. El ambiente de producción del vino se puede dividir en los viñedos y la bodega. Existen muy pocos estudios sobre ecología en los viñedos, por lo que la información sobre los

microorganismos presentes en la uva está muy sesgada. Básicamente las levaduras se distribuyen en el suelo, aire y plantas, donde los insectos tienen una importante función como vectores. La diversidad de levaduras está condicionada por factores como el clima, el estado y la variedad de la uva. Sin embargo, la necesidad de medios selectivos y de largos periodos de incubación para su aislamiento, ha dado lugar a una falta de información sobre las levaduras alterantes que habitan en la uva (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Por otra parte, las levaduras presentes en la bodega proceden tanto de la uva como de insectos, siendo las propiedades intrínsecas del vino las que influirán en la evolución de las comunidades microbianas. Además, el tipo y frecuencia de levaduras alterantes varía, según se trate de la zona de producción, almacenamiento o embotellado. Así, especies procedentes de la uva y que son contaminantes típicas en barril son *P. membranaefaciens*, *P. anomala* y *Candida spp*, que forman películas en la superficie del vino. Ocasionalmente, *M. pulcherrima* y *H. uvarum* pueden producir etil acetato y ácido acético en fases iniciales de la fermentación, deteriorando los vinos (Sponholz, 1992). Se ha sugerido que la presencia de especies de *Brettanomyces* se origina por focos de contaminación en la bodega, como los barriles de roble (Chatonnet y col., 1992). La contaminación del vino también se produce durante el proceso de embotellado, siendo puntos críticos los filtros y los tapones de corcho. En vinos dulces, las contaminaciones se producen por las especies *Z. bailii*, *S. cerevisiae* y *S. ludwigii*, ya que son resistentes a los conservantes y baja a_w del producto final.

Además del origen de las levaduras alterantes, es importante considerar la frecuencia de éstas en la industria de producción. A diferencia de lo esperado, las especies consideradas como alterantes extremófilas (*Z. rouxii*, *Z. bailii*, *Saccharomyces sensu stricto*, *S. ludwigii*), son poco habituales en la industria, y se presentan en muy bajo número (Stratford, 2005). Otras levaduras, que forman parte del grupo 2 de Davenport (levaduras alterantes/higiene) (Tabla 1), se encuentran comúnmente en las industrias, en una frecuencia de aislamiento moderada. Por esta razón, la mayoría de casos de alteración están causados por estas levaduras, dando lugar a signos menos evidentes.

Son muy pocos los trabajos que abordan el estudio del origen de las levaduras y su trazabilidad a lo largo de la cadena de producción del alimento. La utilización de técnicas moleculares para la caracterización de las especies de levadura a nivel de cepa, ha permitido establecer estrategias para la prevención y control de la alteración de alimentos. Pina y colaboradores (2005) estudiaron el origen de contaminación durante la cadena de producción de zumos de naranja envasados, antes y después de la pasteurización, durante el llenado y en el envasado final. El análisis de restricción de la

región ITS-5,8S del rDNA permitió la identificación de levaduras de la especie *Pichia galeiformis*, como responsable de la contaminación. Sin embargo, fue la aplicación de las técnicas de PCR-RAPD y PCR de microsatélites, las que permitieron obtener patrones específicos de cepa en los diferentes aislados de *P. galeiformis*, y asociarlos a los distintos puntos del proceso de fabricación. Estos resultados revelaron que el proceso de pasteurización aplicado había sido ineficiente. Otros trabajos, como el de Malfeito-Ferreira y colaboradores (1997), estudiaron el origen de contaminación por levaduras en plantas de embotellado de vino mediante el perfil de ácido grasos. Sin embargo, esta técnica resulta poco reproducible y el estudio no refleja la diferenciación de cepas en cada especie.

Por tanto, y dado la utilidad de las técnicas moleculares para la trazabilidad de la contaminación por levaduras en el alimento, resulta necesario ampliar los estudios en este campo.

4.3. Detección de levaduras alterantes en el alimento.

Los alimentos constituyen un medio de cultivo muy apropiado para el desarrollo de microorganismos. Su contenido en azúcares, aminoácidos, vitaminas y minerales cubren las necesidades nutricionales de las levaduras, lo que implica que estén asociadas con la alteración de un amplio rango de alimentos, como se detalla en la Tabla 2. Como consecuencia de la actividad metabólica de las levaduras, se producen un conjunto de variaciones, más o menos visibles en el alimento, que dan lugar a cambios que pueden resultar indeseables para el consumidor. Los rasgos más evidentes de alteración en el alimento incluyen producción de gas (que puede producir deformación o rotura de envases), formación de turbidez o sedimentos, formación de colonias en la superficies del alimento, y producción de aromas y sabores indeseables (Loureiro y Querol 1999; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; Stratford, 2005).

La disponibilidad y aplicación de técnicas que permitan realizar una detección de levaduras alterantes de forma rápida, sensible, específica y directa en el alimento, constituye actualmente una necesidad evidente en la industria alimentaria. Algunos trabajos muestran los más recientes desarrollos en técnicas moleculares, pensando en su posterior aplicación industrial. Mediante hibridación in situ con sondas peptídicas de ácidos nucleicos, se ha conseguido detectar de forma específica levaduras alterantes de la especie *D. bruxellensis* en vino (Connel y col., 2002; Stender y col., 2001). Bouchez y colaboradores (2004), utilizaron alternativamente la microscopía de epifluorescencia como método para detectar células de *S. cerevisiae* en fases tempranas de la

fermentación alcohólica, y así analizar la viabilidad de las levaduras durante el proceso fermentativo. Stubbs y colaboradores (1994), desarrollaron una PCR acoplada a la reacción de la ligasa para la detección específica de *Z. bailii* y *Z. bisporus*. Sin embargo, la sensibilidad alcanzada mediante este método fue menor que la obtenida con otras técnicas. A su vez, Ibeas y colaboradores (1996) aplicaron un sistema de detección para especies del género *Dekkera/Brettanomyces* basado en dos reacciones de PCR consecutivas (nested PCR). Con este sistema, llegaron a detectar menos de 10 células en muestras de vino de Jerez contaminado. Menor sensibilidad lograron Cocolin y colaboradores (2004b) cuando aplicaron una PCR específica para la detección de *D. bruxellensis* y *D. anomala* en vino (10^4 - 10^5 UFC/mL). La técnica de RT-PCR también se ha utilizado recientemente para la detección de algunas especies alterantes como zumos de frutas o yogurt. Como ejemplo, Casey y Dobson (2003) examinaron el papel del gen de la citrato sintasa (CS1) en la adaptación de *C. krusei* a ácido acético. Este gen sirvió para diseñar un protocolo de RT-PCR, que resultó ser específico pero poco sensible (6×10^4 UFC/mL). Posteriormente, los mismos autores aplicaron la PCR a tiempo real para la diferenciación de *Z. bailii*, *Z. rouxii*, *C. krusei*, *R. glutinis* y *S. cerevisiae*, potenciales alterantes de zumos de frutas. Además, una optimización del protocolo diseñado a partir de la secuencia del gen CS1, permitió mejorar el límite de detección de *C. krusei* en zumos contaminados (10 copias del gen equivalentes a 120 pg de DNA) (Casey y Dobson, 2004). Como se puede evidenciar de estos trabajos, los límites de detección de levaduras alterantes se han mejorado mediante la aplicación de la técnica de PCR a tiempo real (Tabla 7). En un estudio reciente, Bleve y colaboradores (2003) diseñaron cebadores en la región del gen de la actina (ACT1) para la detección y cuantificación de levaduras en yogurt y alimentos pasteurizados. El método permitió la detección de 10 células viables por mililitro de cultivo puro. Aunque su aplicación permite diferenciar células viables (ya que se basa en la cuantificación de mRNA de actina), la reacción no es específica, detectándose indistintamente las especies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *P. anomala*, *P. membranaefaciens*, *R. mucilaginosa*, *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*. La PCR a tiempo real ha resultado muy exitosa para la detección *D. bruxellensis*, que da lugar a aromas indeseables en vinos por una elevada producción de compuestos fenólicos. La detección de esta especie ha sido abordada en distintos trabajos. Phister y Mills (2003), utilizaron como diana secuencias del 26S rDNA y mediante un protocolo rápido (aproximadamente 3 h), pudieron detectar de forma específica hasta 1 UFC/mL de vino. Sin embargo, Delaherche y colaboradores (2004) no obtuvieron la misma sensibilidad con el gen RAD4 como secuencia diana, detectando 10^4 células por mL de *D. bruxellensis* en vino contaminado (Tabla 7).

Introducción

Por tanto, los sistemas de detección basados en la PCR resultan muy sensibles y específicos, por lo que son adecuados para asegurar la calidad producto final.

Tabla 7. Trabajos publicados sobre cuantificación de levaduras alterantes de alimentos mediante PCR a tiempo real.

Especies	Gen diana	Sistema de detección	Matriz	Límite de detección	Referencias
<i>D. bruxellensis</i>	26S rDNA	SYBR-Green	Vino	1 UFC/mL	Phister y Mills, 2003
Varias especies ^a	ACT1(Actina)	SYBR-Green	Yogurt, leche, queso, zumos de frutas	10 UFC/mL (25pg/μl RNA total)	Bleve y col., 2003
Varias especies ^b	CS1(Citrato sintasa)	SYBR-Green	Zumos frutas	120 pg de DNA (10 copias)	Casey y Dobson, 2004
<i>D. bruxellensis</i>	RAD4	SYBR-Green	Vino	10 ⁴ UFC/mL	Delaherche y col., 2004

^a *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces spp.*; ^b *Zygosaccharomyces bailii* y *rouxii*, *C. krusei*, *R. glutinis* y *S. cerevisiae*

4.4. Cuantificación de levaduras alterantes en el alimento.

Un aspecto importante en los programas de prevención de alteración de alimentos es la posibilidad de realizar una cuantificación de las levaduras a partir de una muestra, y así poder estimar el riesgo de contaminación del alimento por una determinada especie de levadura.

Tradicionalmente se han utilizado los métodos de recuento en placa para la enumeración de levaduras. Sin embargo, aunque estas técnicas son sencillas y están ampliamente aceptadas, resultan largas y tediosas. Alternativamente, el desarrollo de técnicas rápidas, descritas previamente en el apartado 3.2, ha permitido realizar una enumeración más precisa, sensible y reproducible. Algunos trabajos muestran la validez de las técnicas automatizadas como Petrifilm o SimPlate. A modo de ejemplo, Taniwaki y colaboradores (2001) muestran una buena correlación entre los recuentos de levaduras

obtenidos mediante recuento en placa y el método Petrifilm, mientras que no obtuvieron buenos resultados con el método SimPlate. Por otra parte, la técnica de microscopía de epifluorescencia ha sido aplicada para el recuento de levaduras del género *Brettanomyces* a partir de muestras de vino. Así, Millet y Lonvaud-Funel (2000) mostraron una baja correlación de este método con el recuento en placa. Alternativamente, la citometría de flujo se ha comparado con métodos estándar para valorar los cultivos de levaduras presentes en productos de panadería, vino y sidra (Bruetschy y col., 1994; Dinsdale y col., 1995; Jespersen y Jacobsen, 1994). Malacrino y colaboradores (2001), observaron una buena correlación entre los recuentos obtenidos en placa y los recuentos por citometría de flujo para las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus* en fermentaciones de mosto. Sin embargo, los límites de detección de estas levaduras fueron muy altos, 10^3 UFC/mL. Estos mismos niveles fueron determinados por Jespersen y colaboradores (1993) en levaduras alterantes de cerveza

Recientemente, un estudio realizado por García y colaboradores (2004), permitió evaluar la técnica de ELISA con anticuerpos policlonales frente a técnicas genéticas basadas en PCR, para la enumeración de levaduras viables en productos lácteos. Los resultados obtenidos mostraron limitaciones del uso de inmunoensayos para la detección de 10 especies diferentes de levaduras alterantes, mientras que la amplificación por PCR de la región 18S rRNA permitió detectar niveles más bajos, aunque recurriendo a enriquecimientos de la muestra.

A pesar de que estas técnicas han supuesto una mejora en cuanto a la rapidez, y reproducibilidad de la cuantificación de levaduras alterantes de alimentos, en muchas ocasiones la sensibilidad obtenida no satisface las necesidades de la industria alimentaria. Como se describe en el apartado 1.4, muy pocas células pueden causar alteración, por lo que se necesitan técnicas más sensibles, que permitan la detección y enumeración precisa de las levaduras en el alimento. La introducción de la PCR a tiempo real ha supuesto una revolución en el campo del diagnóstico molecular. Las ventajas de su uso frente a otras técnicas se basan fundamentalmente en su sensibilidad, rapidez y posibilidad de realizar una detección del microorganismo de forma cuantitativa. Esto ha supuesto una rápida expansión con numerosas aplicaciones. Entre ellas, la enumeración de microorganismos con interés clínico ha sido muy utilizada. En concreto, la cuantificación de levaduras patógenas, pertenecientes a especies tales como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. lusitaniae*, se ha aplicado con éxito (Brinkman y col. 2003; Frade y col., 2004; Loeffler y col., 2000). Sin embargo, hasta el momento existen pocos trabajos centrados en la detección cuantitativa de levaduras alterantes directamente en el alimento (Tabla 7). Blevé y colaboradores (2003),

Introducción

desarrollaron un protocolo de aproximadamente 10 horas para la cuantificación de levaduras contaminantes de yogurt y productos pasteurizados. Mediante diluciones de mRNA de actina procedente de cultivos mixtos de levaduras y hongos, obtuvieron una buena correlación entre el número total de células y las señales fluorescentes, consiguiendo una linealidad en 6 órdenes de magnitud. La comparación entre valores de recuento por placa y mediante el ensayo de RT-PCR a tiempo real fue también positiva. Sin embargo, aunque se obtuvo una buena sensibilidad (25 pg RNA/ μ L o 10 UFC/mL de *S. cerevisiae*), el método no permite la diferenciación entre las distintas especies de levaduras alterantes de alimentos pasteurizados. Por otra parte, Casey y Dobson (2004) construyeron una curva patrón a partir de diluciones de un fragmento amplificado del gen de la citrato sintasa (CS1), para la cuantificación de la especie *C. krusei* en zumo de manzana. Sin embargo, los resultados no valoran la cuantificación de muestras con pocas células.

Finalmente cabe destacar los estudios recientes aplicados a la enumeración de levaduras alterantes en vinos. Los escasos trabajos se han centrado en la especie *D. bruxellensis*. Así, Phister y Mills (2003) cuantificaron en vino la contaminación producida por *D. bruxellensis* mediante un protocolo de 3 h utilizando SYBR Green. A partir de muestras con contaminación real, la correlación obtenida entre recuento en placa y PCR a tiempo real fue excelente. Delaherche y colaboradores (2004) también analizaron la contaminación de vinos por *D. bruxellensis*. Sin embargo, se obtuvo baja sensibilidad, por lo que los recuentos fueron como mínimo del orden de 10^5 células de *D. bruxellensis* en muestras contaminada.

Objetivos

La importancia de las levaduras se conoce desde hace mucho tiempo y con el desarrollo de la industria, se están utilizando no sólo para la elaboración de un gran número de productos fermentados (cerveza, vino, quesos y embutidos), sino también para la producción de antibióticos, vitaminas, enzimas, etc. Por otra parte, las levaduras tienen también un aspecto negativo ya que son capaces de alterar los alimentos. Aunque dicha alteración no supone un riesgo para la salud, sí que implica pérdidas económicas importantes para las industrias. De aquí el interés por parte de las industrias de alimentos para extremar las medidas de control al respecto. Dichas medidas pueden variar desde el desarrollo de nuevos métodos de conservación, hasta la detección rápida de especies y cepas de levaduras alterantes. Puesto que el interés por las levaduras como alterantes de los alimentos es relativamente reciente, este constituye un campo de investigación con muchas posibilidades. En el presente trabajo se abordan aspectos relacionados con la identificación y caracterización molecular de algunas de las especies típicamente alterantes. La idea es proporcionar a las industrias sistemas nuevos de identificación rápida de levaduras así como mostrar, con ejemplos concretos, la utilidad de la aplicación de las técnicas moleculares para resolver problemas a nivel industrial.

Estas consideraciones nos llevaron a plantear los siguientes objetivos en la presente Tesis Doctoral:

1. Identificación de levaduras del género *Debaryomyces* mediante secuenciación.

1.1. Análisis de restricción de la región 5,8-ITS.

1.2. Análisis de las secuencias de la región 5,8S-ITS.

1.3. Análisis de las secuencias de la región D1/D2 (26S rDNA) y del gen de la actina (ACT1) en especies difíciles de diferenciar.

2. Monitorización de levaduras alterantes durante la producción de turrón de frutas confitadas.

2.1. Identificación de la levadura causante de la alteración.

2.2. Origen de contaminación a lo largo de la cadena de producción de turrón de frutas.

Objetivos

3. Caracterización fisiológica de cepas alterantes de *Zygosaccharomyces bailii* y *Z. rouxii* aisladas de alimentos con alta concentración de azúcares.

- 3.1. Principales características fisiológicas.
- 3.2 Tolerancia y adaptación a condiciones extremas.
- 3.3. Tolerancia a conservantes alimentarios.

4. Estudio del origen de contaminación en vinos por levaduras productoras de 4-etilfenol.

- 4.1. Aislamiento e identificación de levaduras productoras de 4-etilfenol.
- 4.2. Caracterización molecular de aislados de *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii*.
- 4.3. Producción de 4-etilfenol por cepas de *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii*.

5. Identificación rápida y cuantificación de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* directamente de vino mediante PCR a tiempo real.

- 5.1. Diseño de oligonucleótidos y especificidad de PCR.
- 5.2. PCR a tiempo real en cultivos puros.
- 5.3. PCR a tiempo real en vino.

Materiales y Métodos

1. Cepas microbianas.

1.1. Cepas de levadura de colecciones de cultivo.

En el presente trabajo se han utilizado cepas tipo y de referencia obtenidas de distintas colecciones de cultivo: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Colección de cultivos de levadura de Portugal (IGC) y Colección del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI). En concreto, se han analizado 38 cepas pertenecientes a las 15 especies aceptadas actualmente dentro del género *Debaryomyces* (Tabla 8) en el capítulo 1, 34 cepas pertenecientes a especies del género *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii* y *Z. rouxii*) (Tabla 9) en el capítulo 2, 39 cepas vínicas pertenecientes al complejo *Saccharomyces sensu stricto* (20 *S. cerevisiae*, 7 *S. bayanus*, 8 *S. paradoxus* y 4 *S. pastorianus*), y 9 cepas pertenecientes a 9 especies típicamente alterantes de vinos (Tabla 10) en el capítulo 5.

Tabla 8. Cepas tipo y de referencia del género *Debaryomyces* y origen de aislamiento.

Especies	Designación		Fuente de aislamiento
	CECT	CBS	
<i>Debaryomyces carsonii</i>	10227 ^T	2285 ^T	Flujo de <i>Quercus</i>
	10230	810	Vino embotellado
	10541	5254	Alpechin
	11407	4050	Vino
<i>Debaryomyces castellii</i>		2923 ^T	Suelo
<i>Debaryomyces coudertii</i>		5167 ^T	Excrementos de pájaro
<i>Debaryomyces etchellsii</i>	11406 ^T	2011 ^T	Pepino fermentado
	11408	6823	Mantequilla
	11412	2012	Pepino fermentado
<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>var. hansenii</i>	10026		Bacalao salado
	10352		Tomate
	10360		Queso
	11363	1792	Carne congelada
	11364	1102	Salchicha de ternera y cerdo
	11369 ^T	767 ^T	Cereza
<i>var. fabryi</i>	11365	4373	Vino blanco seco
	11370 ^T	789 ^T	Lesión micótica interdigital

Materiales y Métodos

Continuación Tabla 8

Especies	Designación		Fuente de aislamiento
	CECT	CBS	
<i>Debaryomyces maramus</i>	11362 ^T	1958 ^T	Aire
	11371	4264	Sidra
<i>Debaryomyces melissophilus</i>	11409	6898	Suelo
	11410 ^T	6344 ^T	Miel de abeja
<i>Debaryomyces nepalensis</i>		5921 ^T	Suelo
<i>Debaryomyces occidentalis</i>			
<i>var. occidentalis</i>		819 ^T	Suelo
<i>var. personii</i>		2169 ^T	Suelo
<i>Debaryomyces polymorphus</i>			
<i>var. africanus</i>	11361 ^T	6741 ^T	Suelo
<i>var. polymorphus</i>	10099		Leche condensada
	10135		Pimienta dulce
	11359 ^T	186 ^T	Suelo
<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>	10056		Insecto en <i>Populus belleana</i>
	10293		Insecto en <i>Rosa currina</i>
	11360 ^T	2008 ^T	Fluido oscuro de corteza de castaña
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	10687 ^T	2934 ^T	Comida de larva de abejorro
<i>Debaryomyces udenii</i>		7056 ^T	Suelo
<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	10077		Insecto en <i>Syringa vulgaris</i>
<i>var. vanrijiae</i>	10519		Alpechin
	11373 ^T	3024 ^T	Suelo
<i>var. yarrowii</i>	10079 ^T	6246 ^T	Insecto
<i>Debaryomyces yamadae</i>		7035 ^T	Suelo

Abreviaturas: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

Tabla 9. Cepas de referencia de *Z. bailii* y *Z. rouxii* y origen de aislamiento.

Especie	Designación CECT	Fuente de aislamiento
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1898	Insecto, fábrica cerveza, Tokio
	1924	desconocido
	11042	Mosto de uva
	11043	Vino (turbio)
	11352 ^a	Desconocido
	11922	Zumo concentrado de naranja
	11931	Mosto de pera
	11932	Zumo de manzana
	11933	Mayonesa
	11939	Mosto de uva
	11940	Miel
	11952	Vino turbio
	11954	Mosto de uva
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1230
1231		Bombón de sirope de naranja
1232		Mosto concentrado de uva negra
10132		Desconocido
10137		Pasa de Corinto
10312		Pastel de higo
10313		Higo seco
10350		Higo seco
10377		<i>Phoenix dactilifera</i>
10381		Melaza de caña de azúcar
10427		Miel
10445		Mermelada de ciruela fermentada
10633		Miel
11149 ^{bc}		Uva
11941		Salsa de soja
11923		Salsa de soja
11930		Salsa de soja
11928		Mosto concentrado de uva
11926		Mosto concentrado de uva
11929		Limonada
11927	Mosto concentrado de uva	

Abreviaturas de las colecciones de cultivo: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia;

^a Previamente clasificada como *Zygosaccharomyces bisporus*, ^b Previamente clasificada como *Zygosaccharomyces mellis*, ^c Cepa tipo de *Z. polymorphus*.

Materiales y Métodos

Tabla 10. Cepas tipo y de referencia de especies vínicas y alterantes de vinos, y origen de aislamiento.

Especies	Designación	Fuente de aislamiento
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CECT 1640	Zumos de pasas
	CECT 1969	
	CECT 1693	
	CECT 10174	Adulto de <i>Noctua pronuba</i>
	CECT 1941 ^T	
	IFI 369	
	IFI 371	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1462	Fábrica cerveza
	CECT 1475	Vino de Jerez
	CECT 1477	Vino espumoso
	CECT 1483	Mosto
	CECT 1485	
	CECT 1881	Vino
	CECT 1882	Vino
	CECT 1883	Vino
	CECT 1894	Vino tinto
	CECT 1895	Vino rosado
	CECT 1942 ^{NT}	Cerveza
	CECT 1985	
	CECT 10120	Fruta de <i>Arbutus unedo</i>
	CECT 10131	Flor de <i>Centaurea alba</i>
	CECT 10322	Vino blanco
	CECT 10393	Alpechín
	CECT 10557	Mosto de uva
	CECT 10995	
	Cinta Roja ^a	Panadería
	Plus Vital ^a	Panadería
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CECT 1939 ^{NT}	
	CECT 10175	<i>Noctua pronubia</i>
	CECT 10176	<i>Noctua pronubia</i>
	CECT 10308	<i>Quercus lusitanus</i>
	CECT 11143	suelo
	CECT 11152	
	CECT 11158	<i>Drosophila</i> sp.
	CECT 11422	<i>Quercus mongolica</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CECT 1940 ^{NT}	
	CECT 1970	Cerveza
	CECT 11037	Cerveza
	CECT 11185	
<i>Candida rugosa</i>	CECT 11889 ^T	Heces
<i>Candida vini</i>	CECT 11905 ^T	Vino
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 11907 ^T	Lesión micótica
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC 4801	Vino
	CECT 1451 ^T	Cerveza
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CECT 10027	Col ácida
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CECT 1115 ^T	Exudado de olmo
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	CECT 10450 ^T (CECT 1235 ^T)	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT 11197	Mosto de uva
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	CECT 11043	Vino turbio

Abreviaturas de las colecciones de cultivo: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia; IFI, Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid; IGC; Colección de cultivos de levadura de Oeiras, Portugal, ^a Cepas comerciales de panadería de *S. cerevisiae*.

1.2. Cepas de levadura aisladas de alimentos y bebidas.

Durante la realización de este trabajo, se aislaron cepas de levadura a partir de distintas matrices alimentarias. En concreto, se analizaron 200 cepas de levadura aisladas de muestras tomadas a lo largo de la cadena de producción de frutas confitadas, tal y como se describe en el apartado 6 de esta sección. Cuatro de estas cepas, CECT 12001 y CECT 12002 identificadas como *Z. bailii* y CECT 12003 y CECT 12004 identificadas como *Z. rouxii*, se caracterizaron fisiológicamente junto con 7 cepas de especies alterantes proporcionadas por Unilever R&D (Bedford, Reino Unido), procedentes de distintos alimentos (Tabla 11).

Por otra parte, se analizaron un total de 95 cepas pertenecientes a las especies *Dekkera bruxellensis* y *Pichia guilliermondii*. 93 de ellas fueron aisladas de diferentes bodegas y distinto origen geográfico por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Botánica e Ingeniería Biológica del Instituto Superior de Agronomía (Lisboa, Portugal) o proporcionadas por la colección de cultivos de la Universidad de Évora (Portugal) (Tabla 12).

Tabla 11. Cepas de levaduras alterantes utilizadas en el estudio fisiológico.

Espece ^a	Designación	Fuente de aislamiento, país
<i>Zygosaccharomyces lentus</i>	398 ^b	Concentrado de naranja alterado, Reino Unido
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	594 ^b	Mermelada alterada, Suecia
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	593 ^b	Fábrica de refrescos, Filipinas
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	592 ^b	Fábrica de refrescos, Filipinas
<i>Pichia guilliermondii</i>	395 ^b	Refresco alterado, Alemania
<i>Candida halophila</i>	396 ^b	Salsa de soja alterada, China
<i>Candida magnoliae</i>	397 ^b	Salsa de soja alterada, China

^a Identificación de especie mediante análisis de restricción de la región 5,8S-ITS o secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S rDNA; ^b Cepas proporcionadas por Malcolm Stratford, Food Processed Group, Unilever R&D (Bedford, U.K.).

Materiales y Métodos

Tabla 12. Cepas pertenecientes a las especies *Dekkera bruxellensis* y *Pichia guilliermondii* aisladas de bodegas portuguesas con distinta localización geográfica.

Especie ^a	Designación	Fuente de aislamiento ^b
<i>Dekkera bruxellensis</i>	400, 401, 402, 405, 411, 416, 418, 419, 423, 531, 532, 533, 534, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 548	Madera de barrica, bodega 6
	2101, 2102	Vinos tintos, bodega 6
	NP22, NP24, NP26, NP27	<i>Drosophila</i> , bodega 6
	2172	Vino tinto (España)
	2173, 2174	Vino tinto embotellado (California, EEUU)
	2287, 2288	Vino tinto (Utiel-Requena, España)
	1327, 1328, 1601, 1600	Vino blanco espumoso (Ribatejo, Portugal), aislados en 1991 y 1994
	1792, 1794	Vinos tintos (ESB, Portugal) ^c
	1700, 1701, 1702, 1703, 1704, 1791, 2127, 2128, 2129, 2130	Vinos tintos de diferentes bodegas (Dão, Portugal)
	1717	Vino blanco (Estremadura, Portugal)
	2113	Vino tinto embotellado, bodega 11
	2132, 2133	Vino tinto de barril, bodega 11
	2104	Vino tinto, bodega 3
	2114, 2115, 2117, 2118, 2120, 2121	Vinos tintos de diferentes bodegas (Ribatejo, Portugal)
	<i>Pichia guilliermondii</i>	407, 408, 409, 410, 412, 413, 414, 421, 422, 420, 430b
2106, 2119, 2134, 2135, 2136		Uvas, bodega 6
2131		Vino tinto, bodega 6
2137, 2138, 2139		Raspones, bodega 6
2141		<i>Drosophila</i> , bodega 10
2142		Uvas, bodega 10
2145		Raspones, bodega 10
2143		<i>Drosophila</i> , bodega 5
2105, 2122		Uvas, bodega 5
2125		Bomba salida, bodega 5
2126		Prensa rodillo, bodega 5
2107, 2108, 2109		<i>Drosophila</i> , bodega 1
2110		Vino tinto, bodega 4

^a Identificación mediante restricción de la región 5,8S-ITS, ^b Bodegas 1, 3, 4, 5, 6, 10 y 11 de la región de Alentejo (Portugal), las cepas fueron proporcionadas por la Universidad de Évora, Portugal, ^c Cepas proporcionadas por Escola Superior de Biotecnologia, Portugal.

1.3. Cepas bacterianas de colecciones de cultivo.

A lo largo del desarrollo de un sistema de PCR a tiempo real, además de DNA de distintas especies de levadura, se ha utilizado DNA de 2 cepas bacterianas típicas de vinos, *Oenococcus oeni* (CECT 217^T) y *Acetobacter aceti* (CECT 298^T), cuyas condiciones de crecimiento se describen en el apartado 2.2

2. Medios de cultivo.

2.1. Medios para el cultivo de levaduras.

YPD

Extracto de levadura (Pronadisa, Madrid, España)	10 g
Peptona bacteriológica (Oxoid, LTD Basingstoke)	20 g
Glucosa (Panreac, Barcelona, España)	20 g
Agua destilada	1 L
pH 4 (ajustado con HCl)	

GPY

Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
Peptona bacteriológica (Oxoid)	5 g
Glucosa (Panreac)	40 g
Agua destilada	1 L
pH 7 (Ajustado con NaOH)	

GPYA

Extracto de levaduras (Pronadisa)	5 g
Peptona bacteriológica (Oxoid)	5 g
Glucosa (Panreac)	40 g
Agar bacteriológico (Pronadisa)	20 g
Agua destilada	1 L

MEDIO YNB

Medio YNB (Difco)	6,7 g
Glucosa (Panreac)	20 g
Ácido p-coumárico (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)	0,1 g

Materiales y Métodos

Agua destilada	1 L
pH 5,4 (Ajustado con HCl)	

AGAR DBDM

YNB (Difco)	6,7 g
Etanol (Merck)	6% v/v
Cicloheximida (Merck)	10 mg
Ácido p-coumárico (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)	100 mg
Verde bromocresol (Merck)	22 mg
Agar bacteriológico (Pronadisa)	20 g
Agua destilada	1 L
pH 5,4 (Ajustado con HCl)	

AGUA DE PEPTONA

Peptona bacteriológica (Oxoid)	10 g
Agua destilada	1 L

SOLUCIÓN SALINA

Cloruro sódico (Panreac)	1 g
Agua destilada	1 L

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 min., excepto el medio YNB, y el resto de componentes del medio DBDM, que se esterilizaron por filtración (filtros de 0,2 µm, Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Medios para el cultivo de bacterias.

MLO (Medio *Oenococcus oeni*)

Triptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
Glucosa (Panreac)	10 g
Fructosa (Fluka)	5 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O (Panreac)	0,2 g
MnSO ₄ .H ₂ O (Merck)	0,05 g
Citrato diamonio (Sigma)	3,5 g
Hidrocloruro de L-cisteína (Merck)	0,5 g

Extracto zumo tomate	100 mL
Tween 80 (Fluka)	1 mL
Agua destilada	900 mL
pH 4,8 (Ajustado con HCl)	

Medio *Acetobacter aceti*

Glucosa (Panreac)	100 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	10 g
CaCO ₃ (Probus)	20 g
Agar bacteriológico (Pronadisa)	20 g
Agua destilada	1 L

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 min, excepto la L-cisteína, que se esterilizó por filtración (filtros de 0,2 µm, Millipore, Bedford, MA, USA), y se añadió después al medio MLO estéril.

3. Oligonucleótidos.

En este trabajo se han utilizado un conjunto de oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 13. Algunos de estos oligonucleótidos se aplicaron para la identificación de especies de levadura, para la caracterización de cepas dentro de una misma especie o bien para su detección específica. En dicha Tabla, se describe la secuencia de cada cebador, la región diana y la especie de levadura a la cual fueron aplicados. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Roche Diagnostics S.L y Amersham Pharmacia Biotech.

Los oligonucleótidos SC1d y SC1r fueron diseñados con el programa informático Primer Express v. 2.0 (PE Applied Biosystems).

Materiales y Métodos

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' 3')	Región diana	Especie diana	T (°C) ^e	Procedencia
its1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	5,8S -ITS rDNA	general	55,5	White y col., 1990
its4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				"
its2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC				"
its3	GCATCGATGAAGAACGCAG				"
NL-1 ^a	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G	(D1/D2) 26S rDNA	general	55,5	Kurtzman y Robnett, 1998
NL-4 ^a	GGTCCGTGTTTCAAGACGG				
OPA 2 ^b	TGCCGAGCTG	DNA genómico	<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>D. bruxellensis</i>	36	Comercial (Operon Technologies)
OPA 3 ^b	AGTCAGCCAC	"	"	36	"
OPA 7 ^b	GAACGGGTG	"	<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	36	"
OPA 8 ^b	GTGACGTAGG	"	<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>	36	"
OPA 9 ^b	GGGTAACGCC	"	<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>D. bruxellensis</i>	36	"
OPA 10 ^b	GTGATCGCAG	"	<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i>	36	"
OPA 11 ^b	CAATCGCCGT	"	"	36	"
OPA 15 ^b	TTCCGAACCC	"	"	36	"
OPA 16 ^b	AGCCAGCGAA	"	"	36	"
(GAC) ₅ ^c	GACGACGACGACGAC	"	"	45	Baleiras Couto y col., 1996b
(GTG) ₅ ^c	GTGGTGGTGGTGGTG	"	"	55	"
CA21 ^a	ATTGATAACGGTCCGGTATGTG	Gen actina (ACT1)	<i>Debaryomyces</i>	60	Daniel y Meyer, 2003
CA22 ^a	TCGTCGTATTCTTGCTTTGAGATC CAC	"	"		
CA1 ^a	GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGC TG	"	"	45	Kan, 1993
CA15 ^a	TCGGTCAAATCTCTACCAGC	"	"		Daniel y col., 2001
Ca8 ^a	TGTA CTCTTCTGGTAGAACTACCG G	"	"	50	Daniel y col., 2001
CA5 ^a	GTGAACAATGGATGGACCAGATT CGTCG	"	"		Kan, 1993
KS ^a	CGAGGTCGACGGTATCG	Banda RAPDs (Gen NMD3)	<i>S. cerevisiae</i>	55	Primer Universal
SC1 ^d	ACATATGAAGTATGTTTCTATATAA CGGGTG		"	60	El presente trabajo
SC1 ^r	TGGTGCTGGTGCGGATCTA		"	60	"

^a Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y posterior obtención de secuencias. KS es un cebador utilizado para la secuenciación de plásmidos de la serie pBlueScript. ^b Oligonucleótidos utilizados para amplificación por RAPD-PCR, ^c Oligonucleótidos aplicado en la amplificación de microsatélites ^d Oligonucleótidos diseños para los ensayos de PCR a tiempo real, ^e Temperatura de hibridación empleada en el protocolo de PCR.

4. Condiciones generales de cultivo de microorganismos.

4.1. Cultivo de levaduras.

Las levaduras se cultivaron en medio GPY en condiciones de agitación a 28 °C para las cepas *Saccharomyces* y a 25 °C para las no-*Saccharomyces*, incubándose durante 24- 48 horas. En el caso del cultivo de cepas de la especie *D. bruxellensis* se añadieron 5 g/L de carbonato cálcico al medio GPY. Para el aislamiento de levaduras osmotolerantes a partir de frutas confitadas y jarabes, se utilizó medio GPY, al cual se añadió un 8% de glucosa y 50µg/mL de cloramfenicol, para inhibir el crecimiento bacteriano. El periodo de incubación en este caso fue de una semana. Por otra parte, se utilizó el medio DBDM descrito por Rodrigues y colaboradores (2001b) para medir el crecimiento microbiano y la producción de olor fenólico en todos los aislados de bodega (Tabla 12). Para cultivar las levaduras utilizadas en la caracterización fisiológica (Tabla 11), se utilizó medio YPD a pH 4 en botellas McCartney de vidrio. Los medios se inocularon con 10³ UFC/mL, incubándose a 25°C de 2 a 4 semanas.

4.2. Cultivo de bacterias.

La cepa de *Oenococcus oeni* (CECT 217^T) se cultivó en medio MLO en condiciones microaerófilicas, durante 48 horas, mientras que *Acetobacter aceti* (CECT 298^T) se incubó en condiciones aeróbicas. La temperatura de incubación fue 30 °C.

4.3. Enriquecimiento de levaduras a partir de cultivos en GPY y muestras de vino contaminado.

Se inocularon 6 alícuotas de 50 mL de medio GPY (en matraz de 250 mL) con aproximadamente 1-2, 2-3, 5, 10, 20 y 40 UFC de *S. cerevisiae*, para conseguir una concentración de 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 UFC/mL respectivamente. Las muestras se incubaron a 28°C en agitación durante diferentes tiempos (0 h, 8 h, 10 h, 12 h, 16 h y 24 h). Tras el enriquecimiento, se tomaron 5 mL de muestra para posteriormente ser analizadas por PCR a tiempo real (apartado 8.5), y establecer el tiempo mínimo de detección para cada concentración.

Además, el enriquecimiento se llevó a cabo a partir de muestras de vino dulce y tinto. Se tomaron 6 muestras de 5 mL de vino, previamente esterilizado por filtración (filtros de 0,2 µm, Millipore, Bedford, MA, USA), y se inocularon con 200, 100, 50, 25,

Materiales y Métodos

12,5 y 6,25 UFC de *S. cerevisiae* respectivamente. A continuación se añadió 1 mL de cada muestra a 50 mL de GPY para alcanzar las mismas concentraciones que se ensayaron en el caso anterior antes del paso de enriquecimiento. Después de los mismos tiempos de incubación, se tomaron 5 mL de muestra para su análisis por PCR a tiempo real (apartado 8.5).

4.4. Recuento de levaduras y bacterias por métodos clásicos.

4.4.1. Recuento en placa.

Se utilizó el método de recuento en placa para estudiar la correlación entre la cuantificación del número de células de *S. cerevisiae* por este método y por PCR a tiempo real. Para ello, a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial, se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , sembrándose 0,1 mL de cada dilución, por triplicado, en placas Petri con medio GPYA. Las lecturas de recuento se realizaron a las 24 y 48 h de incubación a 25°C. Adicionalmente, como método comparativo, se realizó un recuento de levaduras totales en cámara cuentaglóbulos (cámara de Neubauer).

El método de recuento en placa se utilizó también para la enumeración de bacterias cuando se estudió el efecto de la presencia de DNA contaminante en la cuantificación de células de *S. cerevisiae* (apartado 8.5.8). De cada uno de los cultivos de *O.oeni* y *A. acetii*, se tomaron 2 muestras en diferentes tiempos de la fase exponencial de crecimiento, que tras diluirse en solución salina, se sembraron en placas de MLO o medio *Acetobacter* (apartado 2.2). Las placas se incubaron a 30 °C durante 5 días en el caso de *A. acetii*, y 7 días en el caso de *O. oeni*.

4.4.2. NMP.

Para el recuento de levaduras viables presentes en frutas confitadas, jarabes y turrón, se utilizó la técnica del NMP. Se prepararon 9 tubos que contenían 9 mL de medio GPY (8% de glucosa y 50µg/µL de cloramfenicol). Se tomaron 10 g de fruta o mazapán, o 10 mL de jarabe, y se homogeneizaron en 90 ml de agua de peptona (1%) en un Stomacher. Los tres primeros tubos fueron inoculados con 10 mL del homogeneizado de la muestra, los tres siguientes con 1mL y los tres últimos con 0,1 mL, de forma que contenían 0,1; 0,01 y 0,001g de la muestra inicial. Se incubaron durante un mínimo de 5 días a 30 °C, hasta ver la aparición de turbidez en el medio de cultivo. El NMP de células por cada gramo o mL de muestra se calculó por comparación con una tabla de referencia.

5. Ensayos de caracterización fisiológica de levaduras alterantes.

5.1. Temperatura.

Se analizó la capacidad de crecimiento a 4°C y 37°C, en medio YPD a pH 4, observando el crecimiento microbiano a las 2 y 4 semanas de incubación.

Además, se estimó la temperatura mínima inhibitoria (T.M.I.) de crecimiento de estas levaduras. Para ello, para cada cepa del estudio, se inocularon 10 tubos que contenían 10 mL de medio YPD con 10^3 UFC/mL, y se sometieron a tratamiento térmico en baño con temperaturas de 40; 42,5; 45; 47,5; 50; 52,5; 55; 57,5; y 60°C, durante 25 minutos. Se incluyó una serie de tubos control que no se sometieron a dicho tratamiento. La lectura se realizó durante los 3 días siguientes a la incubación a 25°C.

En un experimento diferente se analizó el efecto de la glucosa sobre la tolerancia al tratamiento térmico. Se determinó la T.M.I. de la cepa *Z. bailii* (CECT 12002), tras tratamientos térmicos entre 40 y 90°C (en intervalos de 5°C), durante 15 minutos. Se utilizaron medios con altas concentraciones de glucosa, en un rango entre 0 y 5 M. El experimento se hizo por triplicado, aplicando el tratamiento a los 10 minutos de la inoculación (A) y a las 4 horas de la inoculación (B). El crecimiento se midió tras 4 semanas de incubación a 25°C.

5.2. Crecimiento a pH bajo.

Se utilizó como medio basal YPD, ajustando el pH con HCl hasta conseguir un rango de pH entre 1,5 y 4.

5.3. Producción de gas.

El gas producido por las cepas de levadura se midió en medio YPD utilizando diferentes cantidades de glucosa: 2% o 18%. Tras la incubación llevada a cabo a 25 °C, se recogió el volumen de gas producido por la fermentación de la glucosa. Para ello se utilizaron jeringas que, una vez introducidas a través de los tapones de goma de las botellas, desplazaban el émbolo al recoger un cierto volumen de gas producido.

5.4. Estudio de la osmotolerancia y adaptación a glucosa.

Para los ensayos de osmotolerancia, las cepas se inocularon en medio YPD, que contenía concentraciones de glucosa entre 1,5 y 5 M (aproximadamente entre 27% p/v y 90% p/v respectivamente). Se incubaron de 2 a 4 semanas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) de glucosa.

Además, se realizó un estudio de la capacidad de adaptación a glucosa de las levaduras. Tras incubar las cepas durante 3 semanas en medio YPD con un rango de concentraciones de glucosa entre 1,5 y 5 M, se valoró el crecimiento de las levaduras mediante densidad óptica a 600 nm. Posteriormente se seleccionó un inóculo de aquellos cultivos que habían mostrado crecimiento en el medio con máximo nivel de glucosa, para realizar una segunda inoculación (de 10^3 UFC/mL) en medios con concentraciones de glucosa superiores a la mínima inhibitoria (hasta 5,5 M). Estos cultivos se incubaron a 25°C durante 3 semanas más, incluyendo un cultivo en medio YPD como control (no adaptado)

5.5. Crecimiento en medios con conservantes.

Se examinó la capacidad de crecimiento de las cepas de levadura en medio YPD que contenía ácido sórbico, ácido benzoico, ácido acético, ácido cinámico, etanol, SO_2 (sulfito sódico) y dimetildicarbonato (DMDC, Velcorin TM), conservante habitualmente utilizados en la industria alimentaria. Además, se analizaron 3 compuestos que habitualmente se aplican como desinfectantes: ácido peracético, hipoclorito sódico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Los conservantes se añadieron al medio YPD a partir de soluciones “stock”, aplicando diferentes volúmenes para obtener un rango fijo de concentraciones. La solución “stock” de ácido sórbico se preparó con sorbato potásico, mientras que el ácido benzoico se analizó mediante la adición de benzoato sódico. El DMDC se preparó en alcohol, y se añadió al YPD inmediatamente después de la inoculación de levaduras, ya que se degrada rápidamente en el agua. El ácido peracético, hipoclorito sódico y H_2O_2 también se añadieron después de la inoculación. La Tabla 14 muestra el rango de concentraciones analizado para cada compuesto inhibitorio.

Tabla 14. Conservantes alimentarios utilizados en este estudio.

Conservante	Rango de concentración
Ácido sórbico	0,2-3 mM/ 0,6-9 mM ^a
Ácido benzoico	0,3-3,6 mM
Ácido acético	0-660 mM
Ácido cinámico	0,05-1,1 mM/ 0,15-3,3 mM ^a
Etanol	0,6-2 M
SO ₂	0,15-4,4 mM
Dimetildicarbonato (DMDC)	0,15-1,8 mM
Ácido peracético	0,5-12 mM
Hipoclorito sódico	0,3-8 mM
H ₂ O ₂	2-24 mM

^a Para estos conservantes, se prepararon dos rangos de concentraciones, en función de las especies a analizar.

6. Procesado de alimentos para el aislamiento de levaduras.

En una industria española productora de fruta confitada, se tomaron muestras de fruta confitada, jarabe y turrón elaborado con dichas frutas.

Se homogeneizaron 10 g de muestra (fruta confitada, jarabe o mazapán de turrón) en agua de peptona (1%) en un homogeneizador Stomacher. Parte del homogeneizado (33,3 mL) se utilizó para el recuento de levaduras el método del NMP tal y como se explica en el apartado 4.4.

El aislamiento de las levaduras se realizó mediante siembra en césped de 0,1mL de muestra que se tomaron de los tubos de NMP o de diluciones seriadas del homogeneizado. Se realizaron además siembras directas de las muestras homogeneizadas en placas de GPYA (con 8% de glucosa). En algunos casos, fue necesario realizar un enriquecimiento de la muestra. Para ello, se añadieron 10 g del homogeneizado a 90 mL de medio GPY (8% de glucosa). Los matraces se incubaron a 28°C en agitación durante 24 horas. Posteriormente se tomó un inóculo para realizar el

Materiales y Métodos

aislamiento de las levaduras en placas con medio GPYA (8% de glucosa). Las placas se incubaron a 28°C de 3 a 5 días. Tras la incubación, se eligieron un total de 200 colonias de forma aleatoria, y posteriormente se identificaron y caracterizaron por técnicas moleculares basadas en el DNA.

7. Cuantificación de fenoles volátiles.

Para cuantificar los fenoles volátiles producidos por las cepas pertenecientes a las especies *P. guilliermondii* y *D. bruxellensis*, aisladas de distintas bodegas portuguesas (Tabla 12), se resuspendió 1 asa de cada cultivo fresco (24h-48h) en solución Ringer. Estos cultivos se inocularon en medio YNB (6,7g/l)(Difco), suplementado con glucosa (20g/L) y ácido p-cumárico (100 mg/L) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). El pH se ajustó a 5,4 y el medio se esterilizó por filtración (filtros de 0,2 µm, Millipore, Bedford, MA, USA). Los fenoles volátiles se midieron siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez y colaboradores (2001b). La extracción de fenoles volátiles se realizó con éter-hexano a partir de una muestra de 50 mL a pH 8, y se separaron recogiendo la fase orgánica de la mezcla. La cuantificación se realizó mediante cromatografía de gases utilizando una columna capilar DB-Wax (J&W Scientific, Folsom, California, USA). Los resultados son la media de, al menos, dos experimentos independientes.

8. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

8.1. Aislamiento de DNA total de levadura.

8.1.1. Método de lisis de protoplastos.

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el método descrito por Sherman y colaboradores (1986) y adaptado por Querol y colaboradores (1992a). Las células de levadura se cultivaron en 5 mL de medio GPY durante 12 horas a 28 °C y se recogieron por centrifugación. El sedimento se resuspendió en 0,5 mL de solución 1 M sorbitol-0,1 M EDTA a pH 7,5. Para obtener los protoplastos, se añadieron 30 µL de “Zimoliasa” 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan) (1mg/mL), incubándose a 37°C entre 30 y 60 minutos. En el caso de levaduras no-*Saccharomyces*, se añadieron además 30 µL de “Novozyme” (Interspex products Foster City, CA, USA) (1 mg/mL). Una vez transferida la muestra a un tubo de centrifuga de 1,5 mL, los protoplastos se recogieron por centrifugación y se incubaron 5 minutos a 65°C en 0,5 mL de solución 50 mM Tris-HCl

(USB, Cleveland, USA) pH 8 y 20 mM EDTA (Panreac) pH 7,4, añadiendo 13 μL de SDS al 10%. Posteriormente se añadieron 0,2 mL de acetato potásico 5 M, manteniendo los tubos en hielo durante 10 minutos para precipitar las proteínas. Se centrifugó 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde el DNA se precipitó mediante adición de 1 volumen de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. El DNA se lavó con etanol al 70% (v/v), se centrifugó, se secó al vacío y se resuspendió en 50 μL de agua mQ.

8.1.2. Extracción por rotura mecánica y sistema “PrepMan kit”.

Para experimentos de PCR a tiempo real, el DNA se aisló mediante el “kit” PrepMan (PE Applied Biosystems, USA). Para ello, se tomó 1 mL de cultivo, o de 4 a 8 mL en el caso de aquellas muestras que contenían un bajo número de células. Las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 5 minutos y posteriormente el sedimento se lavó con agua destilada estéril dos veces. Previamente a la extracción, las células se sometieron a una rotura física como se detalla a continuación. Las células se resuspendieron en el tampón PrepMan y se rompieron en un Mini-beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, Okla.) mediante la adición de 0,3 g de bolitas de zirconio/sílice de 0,5 mm (Biospec Products, Inc). Para la rotura de las células se realizaron agitaciones en 3 repeticiones de 30 segundos cada una a máxima velocidad. Las muestras se incubaron en hielo durante 1 min. entre cada agitación. Posteriormente, el DNA se aisló siguiendo las indicaciones del “kit” PrepMan, con un paso adicional de precipitación necesario para minimizar inhibiciones. Después de resuspender el DNA en 50 μL de agua mQ estéril, se cuantificó la concentración del DNA utilizando un biofotómetro de DNA (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) y se confirmó mediante visualización en gel de agarosa.

8.2. Tratamientos enzimáticos del DNA.

8.2.1. Digestión enzimática del DNA mitocondrial.

El DNA genómico fue digerido con la endonucleasa de restricción *Hinfl* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) según el protocolo descrito por Querol y colaboradores (1992a). La mezcla de reacción contenía 19 μL de DNA genómico, 2 μL de RNAasa a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Boehringer Mannheim), 1,5 μL de enzima y 2,5 μL de tapón 10X específico. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche. Los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial se separaron en geles de agarosa (Pronadisa) al 1% (p/v) en tampón

Materiales y Métodos

TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) a 100 V. Posteriormente se realizó una tinción en bromuro de etidio (0,5 µg/µL), y los fragmentos se visualizaron con luz UV. El tamaño de los fragmentos se calculó con el marcador de DNA de fago λ digerido con *Pst*I.

8.2.2. Digestión enzimática de amplificadas de la región 5,8S-ITS.

Los amplificadas de DNA obtenidos por PCR de la región 5,8S-ITS (ver apartado 8.3.1), fueron digeridos con los enzimas de restricción *Cfo*I, *Hae*III y *Hin*FI (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Para el caso concreto de las especies del género *Debaryomyces* (Tabla 8), se utilizaron adicionalmente otros enzimas: *Alu*I, *Hpa*II, *Rsa*I, *Sau*3AI, *Taq*I (reconocen secuencias de 4 pb), *Dde*I, *Scr*FI (cortan en secuencias de 5 pb) y *Dde*I, *Scr*FI (tienen su diana en secuencias de 6 pb). Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) y se visualizaron con luz UV tras la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/µL) (Sigma). Como marcador de peso molecular se utilizó el “100-bp DNA ladder” (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

8.3. Clonación.

Siguiendo las condiciones de amplificación descritas por Fernández-Espinar y colaboradores (2003), se obtuvo un fragmento de 1800 pb específico de *S. cerevisiae* utilizando el oligonucleótido OPA 7 (GAAACGGGTG) (Operon Technologies) y la cepa *S. cerevisiae* CECT 1485. La banda se cortó a partir de un gel de agarosa al 1,4% y posteriormente el DNA se purificó mediante el “kit” Gene Clean system (BIO 101). Para obtener DNA de extremos romos, el producto de PCR se trató con el fragmento Klenow de la polimerasa I y la DNA polimerasa T4. El fragmento se clonó en el vector pBlueScript digerido con la endonucleasa *Eco*RV y fue defosforilado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Alemania). La ligación se realizó con DNA ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim) y la transformación se llevó a cabo en células competentes de *E. coli* DH5α, siguiendo la metodología descrita por Sambrook y colaboradores (1989). El fragmento clonado se secuenció (apartado 8.6.1) y su secuencia se usó para el diseño de oligonucleótidos específicos de *S. cerevisiae* para ser aplicados en un sistema de PCR a tiempo real (apartado 8.5).

8.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

8.4.1. Amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico.

La región que incluye el gen 5,8S y las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 se amplificó utilizando los oligonucleótidos *its1* e *its4* (White y col., 1990), descritos en la Tabla 13.

Las células procedentes de una colonia se resuspendieron en la mezcla de PCR. Las condiciones de amplificación fueron descritas por Esteve-Zarzoso y colaboradores (1999). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 μ L, añadiéndose 2 unidades de *Taq* polimerasa DyNAzyme™ II (Finnzymes OY, Espoo, Finland), 10x tampón de reacción, 0,3 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), y la muestra de DNA. La amplificación se realizó en un termociclador Progene (Techne, Cambridge, UK) con el siguiente programa: 95°C durante 5 min para la desnaturalización, 40 ciclos de 95°C durante 1 min, 55,5°C durante 2 min y 72°C durante 2 min. Finalmente, se añadió una incubación a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4%, estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA).

8.4.2. Amplificación de los dominios D1 y D2 del gen ribosómico 26S.

Para la amplificación del gen 26S se utilizaron los cebadores NL-1 y NL-4 descritos en la Tabla 13. Los componentes de la reacción de amplificación, así como las condiciones empleadas y el termociclador, fueron las mismas que las utilizadas para amplificar la región 5,8S-ITS (apartado 8.3.1).

8.4.3. Amplificación del gen de la actina (ACT1).

La amplificación del gen de la actina se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Daniel y Meyer (2003). Se utilizaron los cebadores universales CA21 y CA22R para amplificar la región completa del gen. En otros casos, se aplicó la combinación de los cebadores CA8/CA5R con CA1/CA22R y CA1/CA15R con CA8/CA5R, que generaron fragmentos solapantes del gen actina. En la Tabla 13 se describe la temperatura de hibridación para cada cebador utilizado así como su secuencia.

8.4.4. Amplificación específica de la especie *S. cerevisiae* para su detección en muestras de vino.

Con objeto de amplificar de forma específica la especie *S. cerevisiae* pensando en desarrollar un sistema de PCR a tiempo real para dicha levadura (apartado 8.5), se diseñaron 2 oligonucleótidos que se llamaron SC1d y SC1r (Tabla 13). Dichos oligonucleótidos se diseñaron basándose en la secuencia de los primeros 600 pb (apartado 8.6) de una banda de RAPDs específica de *S. cerevisiae* previamente clonada (apartado 8.3). La especificidad de los oligonucleótidos fue comprobada por comparación con las bases de datos (BLAST) y por PCR convencional como se describe a continuación. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ L y contenían 1 U de DNA polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., Madrid), 10x tampón de reacción, 60 mM de los oligonucleótidos SC1d y SC1r (Tabla 13), 0,3 μ M de dNTPs, y 2,5 μ L de DNA. Además, se añadieron 0,05 μ g/ μ L de BSA (seroalbúmina bovina) al igual que se hizo posteriormente en la reacción de PCR a tiempo real para minimizar la inhibición por sustancias presentes en el medio de cultivo o en el vino. Las condiciones de amplificación fueron 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 min a 60°C y 1,5 min a 72°C, utilizando para ello un termociclador GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). Los fragmentos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4%.

8.4.5. Amplificación arbitraria del DNA genómico mediante RAPDs.

Mediante amplificación del DNA de la cepa CECT 1485 con el oligonucleótido OPA 7 (Operon Technologies), se obtuvo una banda de RAPD, específica de la especie *S. cerevisiae*. Para ello, se siguió la metodología descrita por Fernández-Espinar y colaboradores (2003).

Además, se analizaron los perfiles de RAPD generados por los oligonucleótidos descritos en la Tabla 13 (Operon Technologies) para las especies *Z. bailii*, *Z. rouxii* y *D. bruxellensis*. Las reacciones de PCR se realizaron en volumen de 25 μ L y contenían de 1 a 5 ng de DNA, 3,5 mM de $MgCl_2$, 200 ng de oligonucleótido, 25 μ M de cada dNTP y 1U de DNA polimerasa de Biotools (Biotools B&M Labs S.A., Madrid). Se utilizó un termociclador de Progene (Techne) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 92°C durante 1 min, 36°C durante 1 min, 72°C durante 2 min, y una incubación final a 72°C durante 10 min. Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE 1X y se tiñeron con bromuro de etidio.

Los tamaños moleculares de los fragmentos de DNA se obtuvieron por comparación con el marcador molecular de 100 pb.

8.4.6. Amplificación de microsatélites.

Se llevaron a cabo reacciones de PCR siguiendo el protocolo descrito por Baleiras Couto y colaboradores (1996b). Los oligonucleótidos (GTG)₅ y (GAC)₅ se describen en la Tabla 13.

8.5. PCR a tiempo real.

8.5.1. Optimización de la concentración de los cebadores.

La concentración óptima de los cebadores SC1d y SC1r en la reacción de PCR se determinó ensayando combinaciones de distintas concentraciones: 30, 60 y 100 mM, y utilizando una concentración fija de DNA (10 ng/μL). Las condiciones de PCR fueron las descritas en el apartado 8.5.2.

8.5.2. Condiciones de amplificación.

La amplificación se llevó a cabo utilizando el termociclador GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). La reacción de PCR contenía 12,5 μL de SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems), 60 mM de cada oligonucleótido (SC1d y SC1r) y 2,5 μL de DNA a 10 ng/mL, en 25 μL de volumen final. Para minimizar la inhibición por sustancias presentes en el medio de cultivo o en el vino, se añadió BSA (seroalbúmina bovina) a la reacción de PCR, a una concentración final de 0,05 μg/μL. Las condiciones de PCR fueron 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1,5 minutos. Todas las muestras se analizaron por duplicado o por triplicado (en el caso de las muestras que sirvieron para construir la recta patrón).

8.5.3. Curva de disociación.

La curva de disociación del DNA amplificado de cada muestra se procesó de forma automatizada utilizando el programa informático Dissociation Curve v.1.0, incluido en el

sistema GeneAmp 5700. Se obtuvo así un valor de T_m (“melting temperature”), que es específica para cada producto amplificado.

8.5.4. Rectas patrón y eficiencia.

Las rectas patrón se crearon mediante representación gráfica de los valores de C_t (“cycle threshold”) de la PCR a tiempo real, obtenidos a partir de la dilución seriada del DNA frente al valor introducido de concentración de células (log UFC/mL), utilizando el programa informático ABI Prism Sequence Detection v.1.3. A partir de la pendiente de la recta patrón, se estimó la eficiencia (E) mediante la fórmula $E=(10^{-1/\text{slope}}) - 1$. Tanto las curvas de amplificación como las rectas patrón, se representaron mediante el programa informático Sigma Plot v. 8.0.

Se evaluó además, la influencia del vino en la eficiencia del sistema de PCR cuantitativo desarrollado. Para ello, se compararon rectas patrón construidas a partir de medio GPY, vino dulce y vino tinto, las cuales presentaban un rango de concentración de células de $5,8 \times 10^6$ UFC/mL a 5,8 UFC/mL, $3,8 \times 10^5$ UFC/mL a 3,8 UFC/mL y 5×10^6 UFC/mL a 50 UFC/mL respectivamente.

Por otra parte, se analizó la reproducibilidad del método mediante la construcción, en ensayos independientes, de 8 rectas en medio GPY, 4 rectas a partir de vino dulce y 4 rectas a partir de vino tinto. Como se explica posteriormente en el apartado 9, se aplicó un análisis estadístico para analizar el paralelismo entre las curvas obtenidas.

8.5.5. Sensibilidad.

Para determinar la sensibilidad del método de PCR a tiempo real, se aisló DNA a partir de un cultivo en medio GPY de *S. cerevisiae* (CECT 1485) que contenía $5,6 \times 10^7$ UFC/mL. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , y cada dilución se utilizó como muestra para la PCR a tiempo real. Se determinó la presencia de curvas de amplificación, representadas como valores de C_t frente a intensidad de fluorescencia.

Los límites de detección también se valoraron utilizando vino dulce (Moscatel) y tinto (50% Bobal/50% Monastrell) como matriz. Para ello, se inocularon 5 mL de cada tipo de vino con células de *S. cerevisiae* (CECT 1485) hasta conseguir concentraciones de $3,8 \times 10^6$ y 5×10^6 UFC/mL en el vino dulce y tinto respectivamente. El DNA obtenido de dichos cultivos se diluyó para generar un rango de muestras con concentraciones entre $3,8 \times 10^6$ y 3,8 UFC/mL en vino dulce y 5×10^6 y 5 UFC/mL en vino tinto y se sometieron al ensayo de PCR a tiempo real.

Adicionalmente, se analizó el número mínimo de UFC/mL a partir de DNA procedente de muestras independientes con distintas concentraciones de células. Se inocularon 5 muestras que contenían 5 mL de vino tinto con $5,4 \times 10^4$; $5,4 \times 10^3$; $5,4 \times 10^2$; $5,4 \times 10^1$ y 5 UFC/mL respectivamente. De igual manera, 5 muestras de vino dulce fueron inoculadas con $3,9 \times 10^4$; $3,9 \times 10^3$; $3,9 \times 10^2$; $3,9 \times 10^1$ y 3,9 UFC/mL respectivamente. El DNA aislado de cada muestra, se utilizó para la detección por PCR a tiempo real.

8.5.6. Detección en muestras de vino contaminadas artificialmente.

Para evaluar la capacidad del sistema de PCR para detectar células de *S. cerevisiae* en vino, se utilizó vino dulce (Moscatel), obtenido en un supermercado local, y vino tinto (50% Bobal y 50% Monastrell), que fue proporcionado por una bodega española. Se contaminaron artificialmente tres alícuotas de 8 mL de vino dulce (previamente filtrado con filtros de $0,2 \mu\text{m}$, Millipore, Bedford, MA, USA) con $6,8 \times 10^6$; $6,8 \times 10^3$ y $6,8 \times 10$ UFC/mL de la cepa *S. cerevisiae* (CECT 1485) respectivamente. En el caso del vino tinto, las muestras de 8 mL fueron contaminadas con 5×10^4 , 5×10^2 y 5×10 UFC por mL de vino. Los 8 mL de muestra se centrifugaron para recoger las células, y se procedió a la extracción de DNA con el "kit" PrepMan, como se describe en el apartado 8.1.2. El DNA se utilizó para valorar la detección usando el vino como matriz alimentaria, siguiendo los protocolos de PCR a tiempo real desarrollados y los análisis de curvas de disociación. El experimento se repitió dos veces.

8.5.7. Correlación entre la cuantificación por PCR a tiempo real y por recuento en placa.

Se valoró la eficacia de cuantificación del método de PCR a tiempo real mediante correlación entre la enumeración estimada por recuento en placa (apartado 4.4) y por PCR a tiempo real. Para ello, se realizó una dilución seriada de una suspensión de células de *S. cerevisiae* en medio GPY y en vino (Moscatel), para crear muestras de concentración conocida. La población de células se determinó en cada muestra mediante PCR cuantitativa, y se correlacionó con el resultado obtenido mediante recuento en placas de GPYA mediante un análisis de regresión lineal. Se realizaron un total de 4 experimentos independientes, que generaron 4 rectas de regresión, uno utilizando medio GPY y otros 3 con vino dulce (Moscatel).

8.5.8. Efecto de la presencia de DNA contaminante en la cuantificación de células de *S. cerevisiae*.

Se estudió el posible impacto que podía tener la presencia de DNA contaminante sobre la detección y cuantificación específica de células de *S. cerevisiae* por PCR a tiempo real. Para ello, se escogió el DNA correspondiente a otros microorganismos que pueden estar presentes a elevadas concentraciones en las últimas fases de producción del vino. Se incluyeron las cepas *Dekkera bruxellensis* (CECT 1451^T) como levadura representativa, y *Oenococcus oeni* (CECT 217^T) y *Acetobacter aceti* (CECT 298^T) como bacteria láctica y acética, respectivamente. El experimento consistió en combinar dos concentraciones de células de *S. cerevisiae* (10^2 y 10^6 UFC/mL) con dos concentraciones del microorganismo contaminante (10^2 y 10^6 UFC/mL) en vino moscatel, generándose 4 muestras en cada caso. El DNA obtenido se sometió a los ensayos de PCR a tiempo real, y posteriormente se evaluaron las curvas de disociación y los valores de *Ct*, aplicándose análisis estadísticos (ver apartado 9).

8.5.9. Detección y cuantificación en muestras de vino con contaminación real.

Una bodega española de la denominación de origen Utiel-Requena proporcionó 8 muestras de vino tinto (50% Bobal, 50% Monastrell) (7 botellas y 1 envase “bag in box”) que presentaban evidentes signos de alteración por la presencia de gas. A partir de 10 mL de muestra, se obtuvo un precipitado de células cuyo DNA se aisló siguiendo el protocolo de extracción PrepMan (PE Applied Biosystems). Posteriormente, cada muestra se analizó por PCR a tiempo real para detectar la posible presencia de *S. cerevisiae* como levadura contaminante.

Además, se realizó una cuantificación de las células presentes en cada muestra de vino contaminado. Los valores de *Ct* se calcularon por extrapolación en la correspondiente recta patrón, construida a partir de vino contaminado artificialmente con células de *S. cerevisiae* CECT 1485. Paralelamente, se tomó otra alícuota para realizar el recuento de células viables en placa.

8.6. Secuenciación del DNA.

8.6.1. Obtención de secuencias.

Las regiones de DNA de interés (región 5,8S-ITS, dominios D1/D2 del gen 26S y gen ACT1) fueron amplificadas previamente por PCR, como se describe en los apartados 8.4.1, 8.4.2 y 8.4.3. Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando el “kit” UltraClean™ PCR Clean-up (Mo Bio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA). Para su secuenciación, los fragmentos de DNA se marcaron con fluorocromos utilizando el “kit” BigDye™ Terminator Cycle v 3.1 (Perkin Elmer, Norwalk, EE.UU.), secuenciándose ambas hebras en un secuenciador automático 310 de Applied Biosystems (Foster City, EE.UU.). Como cebadores para la reacción de secuenciación se usaron los mismos oligonucleótidos empleados para su amplificación (Tabla 13).

La secuenciación del fragmento de DNA de *S. cerevisiae* obtenido mediante de RAPD se realizó mediante una estrategia diferente. Se secuenciaron los primeros 600 nucleótidos del extremo 5' en un analizador ABI Prism™ 310 Genetic utilizando el “kit” dRhodamine Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (PE Applied Biosystems) y el oligonucleótido KS (Tabla 13). Se obtuvo la secuencia de una de la hebras, y mediante un programa básico de alineamiento (WU-BLAST2) en la página web de EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Blast2/index.html>), se eliminaron las ambigüedades por comparación con la secuencia genómica de *S. cerevisiae*.

8.6.2. Análisis de secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias, los errores se eliminaron por comparación de ambas hebras de DNA usando el programa informático Chromas V 1.43 (Brisbane, Australia).

Las secuencias se alinearon utilizando el programa informático ClustalX, una versión de Clustal W para Windows (Thompson y col., 1994).

En el caso de las especies tipo del género *Debaryomyces* (Tabla 8), las secuencias de la región 5,8S-ITS fueron utilizadas para calcular las distancias genéticas (divergencias nucleotídicas), que permitieron la construcción de un árbol filogenético. Para valorar el modelo que mejor se ajustaba a las características de las secuencias obtenidas (5,8S-ITS), y por tanto el más idóneo para corregir las distancias, se utilizó el programa Modeltest v. 3.6 (Posada, 1998). El modelo que mejor se ajustó fue HKY85 (Hasegawa y col., 1985), con una distribución gamma (G) de tasas de sustitución con un

Materiales y Métodos

parámetro $\alpha=0,1347$, una relación de transiciones/transversiones de 2,337 y frecuencias nucleotídicas empíricas (A, 0,3015; C, 0,1679; G, 0,1796 y T, 0,3510). Posteriormente, con el programa PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 2002), el modelo HKY85 se utilizó para estimar las distancias genéticas que sirvieron para reconstruir un árbol filogenético por el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). La fiabilidad del árbol se valoró mediante un análisis de re-muestreo (bootstrap) basado en 1000 pseudorréplicas de la matriz de secuencias.

9. Análisis estadísticos.

Se calcularon los intervalos de confianza mediante el test de *t*-Student, con un grado de confianza del 5% (Draper y Smith, 1981), para analizar la reproducibilidad de las rectas patrón utilizadas en los ensayos de PCR a tiempo real (apartado 8.5).

El análisis de la varianza de factores múltiples se aplicó utilizando el programa informático Statgraphics Plus v.5.1. Para evaluar si la presencia de microorganismos contaminantes influía en la cuantificación de células de *S. cerevisiae* por PCR a tiempo real, se utilizó el test-*F*, considerando como significativo un valor $P<0,05$.

Capítulo 1: Identificación de levaduras del género *Debaryomyces* mediante secuenciación

El género *Debaryomyces* actualmente está formado por 15 especies (Nakase y col., 1998), las cuales pueden ser aisladas de ambientes naturales (Barnett y col., 1983). De todas ellas, 9 especies, *D. carsonii*, *D. etchellsii*, *D. hansenii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae* y *D. vanriijae*, se encuentran asociadas a una gran variedad de alimentos procesados (Deák y Beuchat, 1996).

Generalmente, la presencia de especies de *Debaryomyces* en los alimentos tiene efectos beneficiosos para los mismos. Así, participan en procesos de maduración de alimentos fermentados como quesos, carne y productos cárnicos, contribuyendo en el aroma final de los mismos por liberación de precursores de compuestos volátiles (Boekhout y Phaff, 2003; Deák y Beuchat, 1996; Fröhlich-Wyder; 2003; Gardini y col., 2001, Martin y col., 2003, 2004). Además, presentan un papel importante en la maduración de encurtidos, donde oxidan los ácidos producidos por las bacterias lácticas durante la fermentación. A pesar de la contribución de levaduras del género *Debaryomyces* en diversos alimentos, un crecimiento excesivo de las mismas puede causar cambios sensoriales indeseables debido a la formación de malos sabores y olores (a putrefacción), por la formación de sulfitos, ésteres y aminas a partir del metabolismo de aminoácidos. Se han descrito como contaminantes en alimentos con alto contenido en sal, como quesos, salami y productos cárnicos (Demain y col., 1998); aunque también se han encontrado como alterantes de yogurt, helados, pescado, marisco, etc. (Deák y Beuchat, 1996). Como consecuencia, su identificación resulta de gran interés para la industria agroalimentaria, ya que permitirá determinar su presencia y distribución en los alimentos, pudiendo controlar el crecimiento de estas levaduras alterantes.

De forma habitual, la identificación de especies del género *Debaryomyces* se ha realizado mediante métodos convencionales. Sin embargo, estas técnicas resultan laboriosas y algunos de los resultados que se obtienen son variables, lo que dificulta la identificación correcta de las especies de este género (Metaxopoulos y col., 1996; Prillinger y col., 1999).

La aplicación de métodos moleculares basados en ácidos nucleicos ha resultado ser una buena alternativa a los métodos convencionales, ya que son más rápidos y precisos. En el caso del género *Debaryomyces*, existen hasta la fecha pocos estudios que aborden la identificación de las especies que lo componen. Dichos trabajos se han centrado fundamentalmente en la identificación de *Debaryomyces hansenii* (Cocolin y col., 2004a; Corredor y col., 2000; Rantsiou y col., 2005; Romero y col., 2005), pero no abordan la identificación de todas las especies del género *Debaryomyces*.

En la última década, los métodos de identificación basados en la secuenciación del DNA ribosómico están siendo ampliamente aplicados para la identificación de especies de levadura. En el caso del género *Debaryomyces*, existen trabajos centrados en el análisis del gen 26S y 18S (Nishikawa y col., 1997, 1999) . Sin embargo, el análisis de secuencias de este gen han revelado una estrecha relación filogenética entre las especies de *Debaryomyces*, lo que dificulta su diferenciación (Kurtzman y Robnett, 1991; Yamada y col., 1991)

Las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1 e ITS2) han mostrado mayores diferencias interespecíficas que las proporcionadas por los genes 18S y 26S rRNA (Cai y col., 1996; James y col., 1996; Kurtzman, 1992; Kurtzman y de Hoog, 1993), permitiendo la diferenciación de especies estrechamente relacionadas. La técnica de análisis de restricción de esta región fue aplicada para diferenciar 10 de las 15 especies del género *Debaryomyces* (Ramos y col., 1998). Sin embargo, este estudio mostró una elevada homogeneidad dentro de esta región.

Esta falta de resolución no concuerda con los datos descritos en la bibliografía en el caso de especies pertenecientes a otros géneros (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Por tanto, en el presente trabajo hemos considerado interesante asegurar que el análisis de restricción de la región 5,8S-ITS no es útil para la diferenciación de las especies del género *Debaryomyces*. Para ello se ha ampliado el análisis de esta región aplicando 7 enzimas de restricción adicionales. Además, se han incluido las especies *D. carsonii*, *D. etchellsii*, *D. occidentalis*, *D. robertsiae* y *D. udenii* para completar la totalidad de especies del género *Debaryomyces*, que no se habían tenido en cuenta en el mencionado trabajo (Ramos y col., 1998). Finalmente, dada la necesidad de proporcionar sistemas alternativos que permitan la identificación rápida e inequívoca de las especies del género *Debaryomyces*, se ha analizado la secuencia de la región 5,8S-ITS de las cepas tipo de cada una de las especies del género, así como la secuencia del gen nuclear ACT1 en algunas especies problemáticas.

1.1. Análisis de restricción de la región 5,8-ITS.

Para amplificar la región 5,8S-ITS de las 38 cepas pertenecientes a las 15 especies aceptadas actualmente en el género *Debaryomyces* (Nakase y col., 1998), se utilizaron los oligonucleótidos *its1* e *its4*.

Los productos de PCR presentaron un tamaño aproximado de 650 pb. Para detectar posibles diferencias entre las cepas analizadas, los fragmentos de amplificación fueron digeridos con 13 endonucleasas de restricción.

Los enzimas *AluI*, *HindIII*, *HpaII*, *NdeI* y *SacI*, no reconocieron ningún sitio de restricción en la región ribosómica de las 38 cepas estudiadas. *HinfI*, *RsaI* y *Sau3A* sólo reconocieron un sitio en esta región, dando lugar a patrones de restricción de 320+320, 490+190 y 400+225 pb, respectivamente. *CfoI* y *HaeIII* generaron patrones de restricción de 310+310+50 y 420+140+90 pb, respectivamente. Sólo *DdeI*, *ScrFI* y *TaqI* mostraron patrones polimórficos en las cepas (Tabla 15). *DdeI* dio un patrón específico para *D. etchellsii*, con tres bandas de 327, 221 y 96 pb, mientras que el resto de especies mostraron el mismo patrón, de 425 y 210 pb. *ScrFI* dio lugar a tres patrones diferentes. Uno de ellos con una única banda de 650 pb (sin sitio de restricción), se obtuvo en 10 especies: *D. carsonii*, *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. hansenii*, *D. nepalensis*, *D. occidentalis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. vanriijae* y *D. yamadae*. En el caso de *D. etchellsii*, *D. maramus*, *D. robertsiae* y *D. udenii*, se encontró un patrón diferente, con 2 bandas de 550 pb y 100 pb. Sólo la cepa tipo de *D. melissophilus*, CECT 11410^T, mostró un patrón distintivo (400 + 240 pb).

Finalmente, *TaqI* mostró dos patrones. Uno de ellos, con fragmentos de restricción de 250, 210, 110 y 60 pb, se encontró en todas las cepas pertenecientes a *D. carsonii*, *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. nepalensis*, *D. maramus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. vanriijae* y *D. yamadae*. El otro patrón, con fragmentos de restricción de 325, 250 y 60 pb, apareció en todas las cepas de *D. etchellsii*, *D. melissophilus*, *D. occidentalis* y en la única cepa analizada de *D. robertsiae* y *D. udenii*. Entre las cepas analizadas de las especies *D. hansenii* y *D. polymorphus*, se encontraron los dos patrones de restricción generados con *TaqI*.

Como se puede derivar de estos resultados, el análisis de restricción de la región 5,8S-ITS no reveló suficiente polimorfismo como para diferenciar la totalidad de las especies que componen el género de *Debaryomyces*. Por ello, se decidió analizar completamente las secuencias de esta región en las especies tipo, como se detalla en el siguiente apartado.

Capítulo 1

Tabla 15. Patrones de restricción obtenidos tras la digestión con tres endonucleasas, y que revelaron algún polimorfismo en la región 5,8S-ITS de las cepas del género *Debaryomyces* analizadas.

Especies	Referencia		Patrones de restricción		
	CECT	CBS	<i>DdeI</i>	<i>ScrFI</i>	<i>TaqI</i>
<i>D. carsonii</i>	10227 ^T		425+210	650	250+210+110+60
	10230		425+210	650	250+210+110+60
	10541		425+210	650	250+210+110+60
	11407		425+210	650	250+210+110+60
<i>D. castellii</i>		2923 ^T	425+210	650	250+210+110+60
<i>D. coudertii</i>		5167 ^T	425+210	650	250+210+110+60
<i>D. etchellsii</i>	11406 ^T		327+221+96	550+100	325+250+60
	11408		327+221+96	550+100	325+250+60
	11412		327+221+96	550+100	325+250+60
<i>D. hansenii</i>					
<i>var. hansenii</i>	10026		425+210	650	325+250+60
	10352		425+210	650	325+250+60
	10360		425+210	650	250+210+110+60
	11363		425+210	650	250+210+110+60
	11364		425+210	650	250+210+110+60
	11369 ^T		425+210	650	325+250+60
<i>var. fabryi</i>	11365		425+210	650	250+210+110+60
	11370 ^T		425+210	650	250+210+110+60

Continuación Tabla 15

Especies	Referencia		Patrones de restricción		
	CECT	CBS	Ddel	ScrFI	TaqI
<i>D. maramus</i>	11362 ^T		425+210	550+100	250+210+110+60
	11371		425+210	550+100	250+210+110+60
<i>D. melissophilus</i>	11409		425+210	650	325+250+60
	11410 ^T		425+210	400+240	325+250+60
<i>D. nepalensis</i>		5921 ^T	425+210	650	250+210+110+60
<i>D. occidentalis</i>					
<i>var. occidentalis</i>		819 ^T	425+210	650	325+250+60
<i>var. personii</i>		2169 ^T	425+210	650	325+250+60
<i>D. polymorphus</i>					
<i>var. africanus</i>	11361 ^T		425+210	650	250+210+110+60
<i>var. polymorphus</i>	10099		425+210	650	250+210+110+60
	10135		425+210	650	250+210+110+60
	11359 ^T		425+210	650	325+250+60
<i>D. pseudopolymorphus</i>	10056		425+210	650	250+210+110+60
	10293		425+210	650	250+210+110+60
	11360 ^T		425+210	650	250+210+110+60
<i>D. robertsiae</i>	10687 ^T		425+210	550+110	325+250+60
<i>D. udenii</i>		7056 ^T	425+210	550+110	325+250+60
<i>D. varinjiae</i>					
<i>var. varinjiae</i>	10077		425+210	650	250+210+110+60
	10519		425+210	650	250+210+110+60
	11373 ^T		425+210	650	250+210+110+60
<i>var. yarrowii</i>	10079 ^T		425+210	650	250+210+110+60
<i>D. yamadae</i>		7035 ^T	425+210	650	250+210+110+60

Capítulo 1

1.2. Análisis de las secuencias de la región 5,8S-ITS.

Ya que no se pudo determinar un perfil distintivo para cada una de las especies de *Debaryomyces* en base a los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS obtenidos, se obtuvo la secuencia de esta región para 17 cepas tipo pertenecientes a las 15 especies de este género (Tabla 16). La longitud completa de las secuencias, incluyendo los 19 y 20 pb de los oligonucleótidos its1 e its 4 respectivamente, variaron entre 635 y 644 nucleótidos.

Tabla 16. Números de acceso de las secuencias en GenBank para las cepas tipo del género *Debaryomyces*.

Especies	Cepas			Número de acceso	
	CECT	CBS	5,8S-ITS	D1/D2 del gen 26S rRNA ^b	Gen Actina
<i>D. carsonii</i>	10227 ^T	2285 ^T	AJ586521		
<i>D. castellii</i>		2923 ^T	AB054102 ^a	U45841	AJ867052
<i>D. coudertii</i>		5167 ^T	AB054018 ^a	U45846	AJ867051
<i>D. etchellsii</i>	11406 ^T	2011 ^T	AJ586528		
<i>D. hansenii (hansenii)</i>	11369 ^T	767 ^T	AJ586526	U45808	AJ508505 ^c
<i>D. hansenii (fabryii)</i>	11370 ^T	789 ^T	AJ586530		
<i>D. maramus</i>	11362 ^T	1958 ^T	AJ586525		
<i>D. melissophilus</i>	11410 ^T	6344 ^T	AJ586529		
<i>D. nepalensis</i>		5921 ^T	AB053099 ^a	U45839	AJ867054
<i>D. occidentalis (occidentalis)</i>		819 ^T	AB054023 ^a		
<i>D. occidentales (persoonii)</i>		2169 ^T	AB054020 ^a		
<i>D. polymorphus (polymor.)</i>	11359 ^T	186 ^T	AJ586523	U45836	AJ604532
<i>D. pseudopolymorphus</i>	11360 ^T	2008 ^T	AJ586524	U45845	AJ604533
<i>D. robertsiae</i>	10687 ^T	2934 ^T	AJ586522	U45805	AJ867053
<i>D. udanii</i>		7056 ^T	AB054098 ^a	U45844	AJ868358
<i>D. vanrijiae</i>	11373 ^T	3024 ^T	AJ586527	U45842	AJ604534
<i>D. yamadae</i>		7035 ^T	AB054022 ^a		

^{a, b, c} Secuencias obtenidas de GenBank; ^b Secuencias obtenidas por Kurtzman y Robnett, 1998; ^c Secuencias obtenidas por Daniel y Meyer, 2003.

Las similitudes de secuencia se muestran en la Tabla 17, por encima de la diagonal, y las diferencias nucleotídicas por debajo de la diagonal. Los valores de similitud encontrados en el conjunto de cepas analizadas varían entre un 85,1% para el par *D. etchellsii/D. carsonii* y un 99,8% para el par *D. castellii/D. pseudopolymorphus*, que correspondían a 54 y 1 diferencias nucleotídicas, respectivamente.

A pesar de que estas diferencias nucleotídicas son, en la mayoría de los casos, suficientes para discriminar especies, en este caso el análisis de restricción de la región 5,8S-ITS no permitió diferenciar las especies de este género, al no encontrar enzimas de restricción que nos mostraran dicha variabilidad. Por tanto, y como una alternativa al análisis de restricción, la identificación de las especies de este género puede abordarse mediante secuenciación directa de esta región ribosómica y su posterior comparación con las secuencias de las bases de datos.

En algunos casos, se obtuvo un alto grado de similitud (98,9 a 99,8%), y que correspondía a diferencias entre 6 y 1 nucleótidos. Esto ocurre con los 10 pares de especies que se detallan en la Tabla 18, y cuyos correspondientes valores de similitud se representan en la Tabla 17. De acuerdo con estos datos, estas especies no podrían distinguirse por comparación de su secuencia 5,8S-ITS y por tanto, tampoco por el análisis de restricción de esta región. Este hecho se visualiza más claramente al utilizar las divergencias nucleotídicas para reconstruir las relaciones filogenéticas entre las especies del género, tal y como se describe en el apartado 8.6.2 de Materiales y Métodos. El árbol filogenético obtenido (Figura 5) muestra, según su fiabilidad determinada por los valores "bootstrap" (VB), que las especies de *Debaryomyces* forman cuatro grupos significativos. El primer grupo (VB 86%) está formado por las especies *D. coudertii*, *D. hansenii* (var. *hansenii* y var. *fabryi*), *D. nepalensis*, *D. maramus* y el par *D. robertsiae* y *D. undenii*. Este grupo incluye especies con muy baja divergencia nucleotídica (Tabla 18), confirmado en el árbol por los bajos valores "bootstrap" (de 33 a 63%), por tanto hay pocas diferencias nucleotídicas que respalden las relaciones dentro del grupo. El segundo linaje, está formado por la especie *D. etchellsii*, que está estrechamente relacionada con el primer grupo, con un valor "bootstrap" del 79%. El tercer grupo (VB 77%) incluye las especies *D. castellii*, *D. yamadae*, *D. vanrijiae*, *D. polymorphus* y *D. pseudopolymorphus*, con muy poca o ninguna divergencia nucleotídica (Tabla 18), y que no podían diferenciarse mediante las secuencias 5,8-ITS. Finalmente, el cuarto grupo (VB 79%) es el más heterogéneo, formado por los pares *D. carsonii* y *D. melissophilus* (91% bootstrap) y *D. occidentalis* var *occidentalis* y var. *persoonii* (72% bootstrap).

Capítulo 1

Teniendo en cuenta estos resultados, los pares de especies descritos en la Tabla 18 no podrían diferenciarse por comparación de las secuencias de la región 5,8S-ITS, ni tampoco mediante el análisis de restricción de esta región. Por tanto, el estudio de otras regiones podría proporcionar un mayor polimorfismo entre estas especies, necesario para su diferenciación.

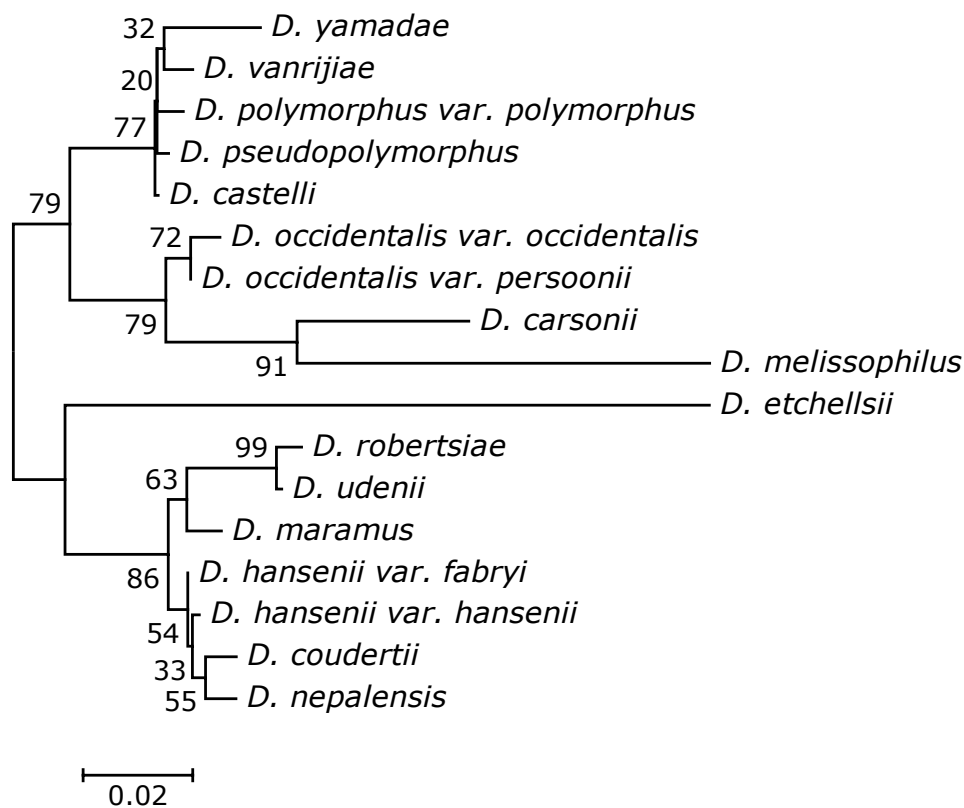


Figura 5. Árbol Neighbor-joining basado en las secuencias de la región 5,8S-ITS de las especies tipo de *Debaryomyces*. Se ha puesto la raíz en un punto intermedio del árbol, localizado a una distancia media entre cada taxón. Los números indican el nivel de "bootstrap" en base a 1000 réplicas. La longitud de las ramificaciones es proporcional a la escala e indican las sustituciones por nucleótido.

1.3. Análisis de las secuencias de la región D1/D2 (26S rDNA) y del gen de la actina (ACT1) en especies difíciles de identificar.

Se analizaron otras dos regiones genómicas, los dominios D1/D2 del gen 26S rRNA (Kurtzman y Robnett, 1998, 2003) y el gen ACT1 (Daniel y Meyer, 2003; Kurtzman y Robnett, 2003) en las especies *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. hansenii*, *D. nepalensis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii* y *D. vanrijiae*. Éstas, tal y como hemos comentado en el apartado anterior, formaban 10 pares difíciles de diferenciar (Tabla 18). Las secuencias correspondientes a la región D1/D2 de estas especies se obtuvieron de la base de datos Genbank NCBI (Tabla 16). Los 10 pares de especies mostraron un alto grado de similitud de secuencia, entre 98,6% para el par *D. polymorphus/D. vanrijiae*, y 99,5% para los pares *D. polymorphus/D. pseudopolymorphus* y *D. robertsiae/D. udenii* (Tabla 18). Estos valores están próximos o son mayores al 99%, que es el valor que se requiere para considerarlos como la misma especie (Kurtzman y Robnett, 1998). Por tanto, teniendo en cuenta el elevado grado de similitud de esta región, dichos pares podrían considerarse la misma especie.

La secuencia parcial del gen de la actina mostró valores de similitud menores, desde 82,8% para *D. robertsiae/D. udenii*, a 96,3% para *D. pseudopolymorphus/D. vanrijiae* (Tabla 18). Según Daniel y Meyer (2003), valores de similitud de secuencia iguales o menores que 98,2% (o más de 17 diferencias nucleotídicas) en esta región indicarían especies distintas, por lo que la secuenciación directa del gen ACT1 podría utilizarse en este caso como herramienta para la diferenciación de los pares de especies del género *Debaryomyces* mencionados.

Tabla 17. Similitudes de secuencia (por encima de diagonal) y diferencias nucleotídicas (por debajo) entre las secuencias de la región 5,8S-ITS de las cepas tipo de las especies del género *Debaryomyces*.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)
(1) <i>D. hansenii (fabryi)</i>		99,8	99,3	98,9	98,2	96,8	97,0	89,9	94,0	92,8	93,6	93,8	93,4	93,6	93,8	89,8	87,4
(2) <i>D. hansenii (hans.)</i>	1		99,4	99,1	98,3	97,0	97,2	90,1	94,2	93,0	93,8	94,0	93,6	93,8	94,0	90,0	87,6
(3) <i>D. coudertii</i>	4	3		98,9	97,8	96,4	96,6	89,9	93,8	92,6	93,4	93,6	93,2	93,4	93,6	89,4	87,4
(4) <i>D. nepalensis</i>	6	5	6		97,4	96,4	96,6	90,7	93,6	92,1	93,2	93,4	93,0	93,8	94,0	89,8	87,4
(5) <i>D. maramus</i>	10	9	12	14		96,4	96,6	89,9	93,6	92,4	93,2	93,4	93,0	92,8	93,3	88,7	86,3
(6) <i>D. robertsiae</i>	17	16	19	19	19		99,1	89,5	91,6	90,5	91,6	91,4	91,4	93,0	93,6	89,2	86,8
(7) <i>D. udenii</i>	16	15	18	18	18	5		89,7	92,4	91,3	92,4	92,2	91,8	93,4	94,0	89,2	87,2
(8) <i>D. etchelsii</i>	51	50	51	47	55	53	52		88,6	87,2	88,6	88,4	88,0	89,9	90,1	85,1	83,0
(9) <i>D. castellii</i>	31	30	32	33	33	43	39	57		98,3	99,3	99,8	99,3	95,0	95,2	90,3	88,3
(10) <i>D. yamadae</i>	37	36	38	40	39	48	44	63	9		97,6	98,1	97,9	95,2	95,0	90,5	88,3
(11) <i>D. polymorphus (poly.)</i>	33	32	34	35	35	43	39	57	4	13		99,4	99,3	94,6	94,8	89,9	87,9
(12) <i>D. pseudopolym.</i>	32	31	33	34	34	44	40	58	1	10	3		99,1	94,8	95,0	90,5	88,6
(13) <i>D. vanrijae</i>	34	33	35	36	36	44	42	60	4	11	4	5		94,5	94,6	90,1	87,9
(14) <i>D. occidentalis (occid.)</i>	33	32	34	32	37	36	34	51	26	25	28	27	29		99,4	93,0	90,5
(15) <i>D. occidentalis (perso.)</i>	32	31	33	31	36	33	31	50	25	26	27	26	28	3		93,2	90,7
(16) <i>D. carsonii</i>	51	50	53	51	56	54	54	54	72	48	51	48	50	36	35		91,8
(17) <i>D. melissophilus</i>	62	61	62	62	67	65	65	63	81	58	60	57	60	48	47	42	

(1) cepa CECT 11370^T, (2) cepa CECT 11639^T, (3) cepa CBS 5167^T, (4) cepa CBS 5921^T, (5) cepa CECT 11362^T, (6) cepa CECT 10687^T, (7) cepa CBS 7056^T, (8) cepa CECT 11406^T, (9) cepa CBS 2923^T, (10) cepa CBS 7035^T, (11) cepa CECT 11359^T, (12) cepa CECT 11360^T, (13) cepa CECT 11373^T, (14) cepa CBS 819^T, (15) cepa CECT 2169^T, (16) cepa CECT 10227^T, (17) cepa CECT 11410^T. Las similitudes de secuencia entre especies que superan 99% están escritas en negrita.

Tabla 18. Datos de reasociación de nDNA y similitud de secuencia de la región 5,8S-ITS, de los dominios D1/D2 del gen 26S y el gen ACT1 de las cepas tipo de las especies del género *Debaryomyces*, que no pudieron identificarse mediante restricción o secuenciación directa de la región 5,8S-ITS.

Especies	Designación cepa	Reasociación nDNA (%)	Similitud secuencia (%)		
			5,8S-ITS	D1/D2	ACT1
<i>D. polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i> <i>D. pseudopolymorphus</i>	CECT 11359 ^T CECT 11360 ^T	21 ^a	99,4 ^g	99,5 ^f	92,4 ^b
<i>D. polymorphus</i> var. <i>polymorphus</i> <i>D. vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i>	CECT 11359 ^T CECT 11373 ^T	24 ^a	99,3 ^g	98,6 ^f	93,2 ^c
<i>D. pseudopolymorphus</i> <i>D. vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i>	CECT 11360 ^T CECT 11373 ^T	NE	99,1 ^g	98,8 ^f	96,3 ^c
<i>D. hansenii</i> var. <i>hansenii</i> <i>D. coudertii</i>	CECT 11369 ^T CBS 5167 ^T	16 ^a	99,4 ^g	99,4 ^e	85,7 ^c
<i>D. hansenii</i> var. <i>hansenii</i> <i>D. nepalensis</i>	CECT 11369 ^T CBS 5921 ^T	15 ^a	99,1 ^g	99,1 ^f	90,7 ^b
<i>D. coudertii</i> <i>D. nepalensis</i>	CBS 5167 ^T CBS 5921 ^T	NE	98,9 ^g	98,8 ^e	85,2 ^b
<i>D. robertsiae</i> <i>D. udenii</i>	CECT10687 ^T CBS 7056 ^T	NE	99,1 ^g	99,5 ^f	82,8 ^d
<i>D. castelli</i> <i>D. polymorphus</i>	CBS 2923 ^T CECT 11359 ^T	20 ^a	99,3 ^g	99,1 ^f	91,5 ^b
<i>D. castelli</i> <i>D. pseudopolymorphus</i>	CBS 2923 ^T CECT 11360 ^T	NE	99,8 ^g	98,9 ^f	95,5 ^b
<i>D. castelli</i> <i>D. vanriijae</i>	CBS 2923 ^T CECT 1137 ^T	NE	99,3 ^g	98,8 ^f	95,6 ^c

NE, Datos no encontrados en la literatura; ^a datos de reasociación de nDNA de Kurtzman y Robnett, 1998; ^b Basado en el análisis de 959 nucleótidos del gen actina; ^c Basado en el análisis de 904 nucleótidos del gen actina; ^d Basado en el análisis de 658 nucleótidos del gen actina; ^e Basado en el análisis de 511 nucleótidos de D1/D2; ^f Basado en el análisis de 571 nucleótidos de D1/D2; ^g Basado en el análisis de 576 nucleótidos de la región 5,8S-ITS

1.4. Discusión.

De forma habitual, la identificación de especies del género *Debaryomyces* se ha llevado a cabo mediante métodos convencionales. Sin embargo, dado los resultados variables obtenidos en cuanto a sus capacidades fermentativas y características fisiológicas, la identificación correcta de las 15 especies que forman actualmente el género resulta difícil de esta manera. Otras aproximaciones dirigidas a la identificación de algunas especies de *Debaryomyces* no han sido muy resolutivas, como es el caso del % G+C en la composición del DNA, el análisis del sistema ubiquinona, los antígenos de pared celular o las características fisiológicas o bioquímicas (Nakase y Suzuki, 1985). Sólo la reasociación de nDNA-nDNA resultó exitosa para la diferenciación entre estas especies (Nakase y Suzuki, 1985), pero es una técnica demasiado compleja para realizar una identificación de forma rutinaria.

La aplicación de métodos basados en biología molecular es muy útil pensando en la identificación rutinaria de levaduras por su rapidez y precisión. Como se ha comentado en la introducción del presente capítulo, existen pocos estudios que aborden la identificación molecular de las especies que componen el género *Debaryomyces*. Además, la mayoría de estos estudios se centran en la especie *D. hansenii* (Cocolin y col., 2004a; Corredor y col., 2000; Nishikawa y col., 1997, 1999; Rantsiou y col., 2005) o abordan la identificación de un número restringido de especies (Cai y col., 1996; Kurtzman y Robnett, 1991; Ramos y col., 1998; Romero y col., 2005; Yamada y col., 1991). En este último caso, la diferenciación entre las especies es difícil a pesar de utilizar técnicas cuya capacidad para identificar especies de levadura ha sido demostrada en trabajos previos para otros géneros. Este es el caso del análisis comparativo de secuencias de las regiones ribosomales 26S y 18S (Kurtzman, 2003; Kurtzman y Robnett, 1998) y del análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS (Esteve-Zarzoso y col., 1999, 2003; Fernández-Espinar y col., 2000; Guillamón y col., 1998). Una reciente colaboración ha permitido abordar el estudio de una región alternativa, la IGS, para la discriminación de las especies que comprenden el género *Debaryomyces* (Quirós y col., enviado).

Dado el papel de las especies del género *Debaryomyces* en el procesado y en la alteración de gran variedad de alimentos, consideramos interesante disponer de un método para su identificación. Desde un punto de vista industrial es deseable que el método de identificación sea de fácil aplicación y que además proporcione resultados lo antes posible y de forma reproducible. En este sentido, la técnica de análisis de restricción de la región ribosomal 5,8-S-ITS constituye actualmente la mejor alternativa. Además, la disponibilidad de una base de datos de fácil acceso (<http://yeast-id.com/>) conteniendo los perfiles de

restricción de más de 200 especies, hace de esta técnica una herramienta especialmente útil para aplicaciones rutinarias. Ramos y colaboradores (1998) mostraron la falta de resolución al aplicar dicha técnica para la identificación de las especies de *Debaryomyces*. Sin embargo, estos autores no muestran si esta falta de resolución es el resultado de un bajo polimorfismo nucleotídico a nivel de esta región ribosómica al igual que ocurre para los genes 26S y 18S. Por tanto, cabía la posibilidad de que el uso de enzimas de restricción alternativas permitiera detectar variaciones nucleotídicas entre las especies, y así poder diferenciarlas en base a sus perfiles de restricción. Con esta idea, se ensayaron los enzimas de restricción *DdeI*, *HindIII*, *Hinfl*, *NdeI*, *Sau3A1*, *Scal* y *ScrFI* y se extendió la metodología al total de las especies del género. Al igual que en el trabajo descrito por Ramos y colaboradores (1998), se observó una falta de resolución obteniéndose un número reducido de patrones diferentes que a su vez eran compartidos por más de una especie. Desgraciadamente, con estos datos confirmábamos que la técnica de análisis de restricción de la región 5,8S-ITS no es útil para la identificación de las especies del género *Debaryomyces*.

Ya que hasta el momento no se ha estudiado el origen del bajo polimorfismo obtenido en los sitios de restricción, en el presente trabajo se decidió analizar la secuencia de la región 5,8S-ITS. Se pudo así determinar, a diferencia de lo que ocurre para otros géneros, que era una región muy conservada. Sin embargo, en ciertas ocasiones las diferencias nucleotídicas fueron suficientes para diferenciar parejas de especies. Este es el caso de *D. carsonii*, *D. etchelsii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. occidentales* y *D. yamadae*, que mostraron valores de similitud de secuencia menores al 99% con todas las especies. Por tanto, su identificación puede abordarse mediante la comparación de secuencia de esta región ribosómica. La diferenciación de estas especies, excepto *D. maramus* que mostró un valor de similitud del 98,9% con *D. coudertii*, puede abordarse también mediante la comparación de secuencias de D1/D2 del gen 26S rRNA, según se dedujo del análisis de las correspondientes secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank NCBI. El análisis mostró valores de similitud entre 88% y 98,4%.

Por otra parte, las especies *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. hansenii*, *D. nepalensis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii* y *D. vanrijiae*, mostraron elevada similitud de secuencia en la región 5,8S-ITS, por encima del 99%, cuando se compararon con una o varias especies. Es el caso de *D. castelli* con *D. vanrijiae* (99,3%), *D. coudertii* con *D. nepalensis* (98,9 %), *D. robertsiae* con *D. udenii* (99,1%), *D. polymorphus* con *D. pseudopolymorphus*, *D. castellii* y *D. vanrijiae* (99,4, 99,3 y 99,3% respectivamente), *D. pseudopolymorphus* con *D. vanrijiae* y *D. castellii* (99,1 y 99,8% respectivamente) y *D. hansenii* var. *hansenii* con *D. coudertii* y *D. nepalensis* (99,4 y 99,1% respectivamente). La

similitud de secuencia de ITS fue muy próxima o mayor al 99%, y por tanto, en estos casos no es posible realizar una designación diferenciada de especie por comparación de la secuencia de esta región. El análisis de secuencias de los dominios D1/D2 del 26S rRNA también indicó que estos 10 pares de especies están estrechamente relacionados y son difíciles de diferenciar. La baja divergencia nucleotídica encontrada entre estos pares de especies de *Debaryomyces*, no es congruente con los bajos valores de reasociación disponibles en la literatura (Tabla 18) (Kurtzman y Robnett, 1997). Aunque las regiones ribosómicas han sido de gran utilidad para la delimitación de otras especies, existen otras excepciones al igual que ocurre con el género *Debaryomyces*. Es el caso de *Candida fructus* y *Candida musae* o *Candida zelanoides* y *Candida krissii* (de Llanos y col., 2004; Kurtzman y Robnett, 1998;), y *Rhodospordium glutinis* y *Rhodospordium graminis* (Scorzetti y col., 2002), entre otros.

Puesto que la identificación de las especies del género *Debaryomyces* no está actualmente resuelta en su totalidad, consideramos interesante abordar la búsqueda de marcadores moleculares alternativos que permitieran su diferenciación inequívoca. Por este motivo se estudiaron otras regiones que permitieran la diferenciación aquellas especies más estrechamente relacionadas. De esta forma se secuenció el gen de la actina ACT1, cuya variabilidad en la secuencia de DNA ya se ha mostrado previamente en grupos taxonómicos muy próximos (Daniel y col., 2001; Daniel y Meyer, 2003; Kurtzman y Robnett, 2003). Como resultado, el gen ACT1 dió lugar a suficiente divergencia nucleotídica, desde 82,8% a 96,3%, para poder diferenciar las especies directamente por secuenciación. Esto supone que, en un futuro, se pueden desarrollar métodos moleculares basados en la secuencia de esta región, con la finalidad de identificar de forma rápida y sencilla estas especies. Una región alternativa que se utilizó también en este análisis de secuencias fue el gen mitocondrial COX2 (Belloch y col., 2000). Sin embargo, a pesar de aplicar oligonucleótidos diseñados a partir de los cebadores originales, diseñados por Belloch y colaboradores (2000), no se pudo obtener el fragmento amplificado de esta región, y por tanto no se pudo utilizar en nuestro estudio.

En conclusión, la identificación de las especies actualmente aceptadas en el género *Debaryomyces*, no puede abordarse mediante el análisis de restricción de la región ribosómica 5,8S- ITS, como se ha propuesto para otras especies. En el presente trabajo (Martorell y col., 2005a) se propone su identificación por comparación de secuencias. En concreto, la identificación de las especies *D. carsonii*, *D. etchelsii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. occidentalis* y *D. yamadae*, se puede abordar mediante comparación de secuencias de la región 5,8S-ITS. En el caso de las especies *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. hansenii*, *D. nepalensis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii* y

D. vanrijae, se determinó una elevada similitud de secuencia en las regiones ribosómicas, por lo que se propone la comparación de secuencias del gen de la actina ACT1 para la designación inequívoca de especie. Actualmente, la disponibilidad de secuenciadores de DNA automáticos y la posibilidad de secuenciar directamente productos de PCR, hace que esta técnica resulte sencilla y rápida para la identificación de especies de levadura, y por tanto, de gran utilidad para la industria.

Capítulo 2: Monitorización de levaduras alterantes durante la producción de turrón de frutas confitadas.

Además del género *Debaryomyces* existen otros géneros de levaduras con especies que, como se comentó en la Introducción, pueden estar implicadas en la alteración de gran variedad de alimentos, resistiendo las condiciones ambientales y las medidas de conservación aplicadas al alimento (Fleet, 1992; Loureiro y Querol, 1999). Entre los alimentos susceptibles de alteración se encuentran aquellos con un elevado contenido en azúcar. En estos, la estabilidad depende de factores como la a_w , pH, presencia de conservantes y temperatura. Habitualmente, valores de a_w entre 0,61 y 0,75 provocan un crecimiento muy lento en las levaduras, por lo que los signos de alteración son aparentes sólo después de algunos meses. Únicamente en condiciones de almacenamiento con elevada humedad relativa, los productos azucarados incrementan su a_w , permitiendo la aceleración del crecimiento de las levaduras (Deak y Beuchat, 1996). Entre los signos de alteración más típicos está la formación de películas en la superficie de jarabes, debido a la suspensión de las células de levadura por la elevada densidad de los jarabes, o rotura de envases por producción de gas (Stratford, 2005). Fue precisamente la deformación y rotura de envases por fermentación microbiana lo que obligó a la retirada de un lote de turrón del mercado Español. El presente capítulo incluye la identificación de los microorganismos causantes de esta alteración así como el estudio del origen de la contaminación.

2.1. Identificación de la levadura causante de la alteración.

Como se comentó en el capítulo anterior, una de las técnicas más utilizadas para la identificación de levaduras a nivel de especie es la amplificación de la región 5,8S-ITS y su posterior análisis de restricción. Los perfiles de restricción obtenidos son comparados con los contenidos en la base de datos disponible en la dirección de Internet <http://yeast-id.com/>. En el presente trabajo, esta técnica se ha aplicado para resolver un problema de contaminación a nivel industrial. Como se detalla a continuación, en primer lugar se aislaron y se identificaron los microorganismos presentes en el turrón alterado. Además, puesto que dicho turrón contenía en su composición frutas confitadas elaboradas en una empresa distinta a la del turrón, se aislaron e identificaron los microorganismos presentes en dicha empresa.

2.1.1. Recuento e identificación de microorganismos en el turrón alterado.

En el caso de los turrónes alterados, se analizaron por separado las piezas de fruta y la masa de mazapán. Tal y como se describe en Materiales y Métodos, se inocularon 9 tubos que contenían 9 mL de medio GPY (8% de glucosa y 50µg/µL cloramfenicol) con diferentes volúmenes de un homogeneizado de la muestra. La aparición de turbidez en el medio de cultivo permitió determinar el NMP de células viables por mL de muestra. Tan sólo fue posible observar crecimiento en una muestra de calabaza y en el mazapán. Así, se determinaron 200 UFC/g en la calabaza confitada y más de 1100 UFC/g en el mazapán. Una vez llevado a cabo el aislamiento de 10 colonias por cada muestra, se utilizó la técnica de análisis de restricción de la región 5,8S-ITS para identificar dichos aislados. De este modo se mostró la presencia de la especie *Z. bailii* en la muestra de calabaza (Tabla 19). Sin embargo, en el caso del mazapán las colonias aisladas pertenecían a un hongo filamentoso, que no pudo identificarse mediante esta técnica.

Para la identificación de este hongo se seleccionaron tres cepas y se secuenciaron los dominios D1/D2 del gen 26S rDNA. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de las bases de datos (Blastn) obteniéndose una homología del 97% con la secuencia del gen 26S rRNA de *Nectria mauritiicola* (Tabla 19). Así mismo, se secuenció esta misma región en el caso de la cepa de levadura identificada como *Z. bailii*, confirmándose su previa identificación.

2.1.2. Recuento e identificación de microorganismos en la empresa de frutas confitadas.

Con objeto de evaluar la presencia de levaduras alterantes en la empresa de frutas confitadas, se procedió al aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en todos los puntos de la cadena de producción de dicha empresa. Como consecuencia de los múltiples pasos que se siguen en el procesamiento industrial de dichas frutas fue necesario tomar un gran número de muestras como se comenta a continuación. Las frutas confitadas se elaboran de forma tradicional a partir de la maceración de las mismas con jarabes de sacarosa y glucosa. Dicha maceración se realiza en tanques de metal, aumentando la concentración de los jarabes de forma gradual (mediante evaporación continua al mantenerlos a 40°C), para permitir la entrada del azúcar al interior de la fruta y evitar su deformación. Además, frutas de diferentes clases no pueden confitarse en el mismo jarabe. Finalmente se realiza un secado de las piezas de fruta, de forma que éstas alcanzan un contenido en azúcar entre un 70% y

75%. En base a este proceso de elaboración se tomaron un total de 22 muestras (tanto jarabes como frutas) en distintas etapas del proceso de fabricación: muestras en maceración con distintos grados brix; muestras que permanecieron almacenadas de 1 a 8 meses en su propio jarabe, y muestras envasadas que se habían almacenado hasta 2 años (Tabla 19). El procesado de las muestras para el recuento e identificación de levaduras se realizó utilizando medio GPY con elevado contenido en glucosa, para evitar el choque osmótico de las levaduras al ser aisladas a partir de jarabes y frutas confitadas (apartado 6 de Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos en los recuentos de levaduras se detallan en la Tabla 19. Los recuentos más altos se observaron en los jarabes utilizados para la maceración de las frutas, pudiéndose determinar 23, 4 y 39 UFC/mL en muestras de jarabe de calabaza (50° brix), jarabe de naranja (60° brix) y jarabe de cereza (40° brix) respectivamente. Incluso se llegaron a determinar hasta más de 1100 UFC/mL en jarabes de calabaza (65° brix) y cereza, éste último con evidentes signos de alteración por fermentación. En cuanto a las muestras almacenadas en jarabe (Tabla 19), el recuento también fue mayor en el jarabe de calabaza (23 UFC/mL), sin obtenerse un recuento en la calabaza confitada. En el caso de las frutas, se determinaron recuentos más altos en muestras de calabaza y cereza confitada (23 UFC/g), mientras que no fue posible determinar la presencia de levaduras en piezas de naranja confitada. En cuanto al efecto del tiempo en la carga microbiana en las frutas, se observó que tiempos largos dieron lugar a cargas microbianas mayores, de forma que muestras de jarabe y fruta almacenadas hasta 8 meses contenían 23 UFC por mL ó g (sin mostrar ningún síntoma de alteración visible), llegando incluso a recuentos de hasta 240 UFC/g en muestras envasadas y almacenadas hasta dos años.

En la Tabla 19 se muestran igualmente los resultados de la identificación de los microorganismos aislados a lo largo de la cadena de producción. Se identificaron 4 especies: *Z. bailii* y *Z. rouxii* que se aislaron con gran frecuencia tanto en jarabes como en frutas confitadas de distintos grados brix (40, 50, 60 y 65° brix); *Sporobolomyces roseus* que se encontró en dos muestras, calabaza confitada a 65° brix y calabaza envasada y almacenada durante 2 años; y *Debaryomyces hansenii* que se aisló a partir de dos muestras de calabaza almacenada durante 2 años.

Para confirmar la asignación correcta a nivel de especie de estas cepas, se seleccionaron al azar tres cepas de cada patrón de restricción de 5,8S-ITS obtenido y al igual que en el caso de los aislados a partir de turrón alterado se secuenciaron los dominios D1/D2 del gen 26S rDNA. Se confirmó así la identificación de las levaduras

Capítulo 2

aisladas (*Z. bailii*, *Z. rouxii*, *D. hansenii*, *S. roseus*), obteniéndose valores de similitud entre 99 y 100% con las correspondientes secuencias de las bases de datos (Tabla 19).

Tabla 19. Identificación de levaduras y recuento mediante Número Más Probable (NMP) de los aislados de muestras de fruta confitada y turrón alterado.

Fase en la cadena de producción	Muestras	° brix	NMP (1 mL ó g)	Identificación RFLPs (5,8-ITS)
Muestras de turrón alterado	Mazapán		>1100	<i>Nectria mauriiticola</i> ^a
	Calabaza confitada		200	<i>Z. bailii</i> (CECT 12002)
Muestras en fabricación	Jarabe de calabaza confitada	50	23	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
	Calabaza confitada	50	0	N.D.
	Jarabe de calabaza confitada	65	>1100	<i>Z. bailii</i> (CECT 12001)
	Calabaza confitada	65	<23	<i>Sporobolomyces roseus</i>
	Calabaza glaseada		<23	<i>Z. bailii</i>
	Jarabe de naranja confitada	24	0	N.D.
	Naranja confitada	24	0	N.D.
	Jarabe de naranja confitada	60	4	<i>Z. rouxii</i>
	Naranja confitada	60	0	N.D.
	Naranja glaseada		0	N.D.
	Jarabe de cereza confitada	40	39	<i>Z. bailii</i>
	Cereza confitada	40	<23	<i>Z. bailii</i>
	Jarabe fermentado de cereza confitada			>1100
Muestras almacenadas en jarabe (de 1 a 8 meses)	Jarabe de calabaza confitada		23	<i>Z. rouxii</i>
	Calabaza confitada		0	N.D.
	Jarabe de cereza confitada		23	<i>Z. bailii</i>
	Cereza confitada		<23	<i>Z. bailii</i>
	Jarabe de naranja confitada		0	N.D.
	Naranja confitada		0	N.D.
Muestras almacenadas envasadas (hasta 2 años)	Calabaza confitada		240	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	Calabaza confitada		240	<i>D. hansenii</i>
	Calabaza confitada		240	<i>S. roseus</i>

N.D.: no detectado; ^a Su identificación sólo fue posible mediante secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S rDNA.

2.2. Origen de contaminación a lo largo de la cadena de producción de turrón de frutas.

De todos los microorganismos identificados tanto en el turrón alterado como en la empresa de frutas, *Z. bailii* y *Z. rouxii* tienen una importancia particular por ser potentes alterantes de alimentos con baja a_w y alto contenido en azúcares. Por este motivo y teniendo en cuenta la elevada frecuencia con que la especie *Z. bailii* fue encontrada en el turrón alterado y en la empresa de las frutas parece probable que esta última haya sido la fuente de la contaminación. Por otra parte, aunque *Z. rouxii* no se detectó en el turrón alterado, su presencia en la empresa que elaboró las frutas lo convierte en alterante potencial de turrones elaborados con dichas frutas. Para la prevención y el control de la alteración de los alimentos por levaduras, es necesario abordar estudios de trazabilidad de las mismas a lo largo de la cadena de producción y así poder establecer el origen de la contaminación. En este sentido, las técnicas moleculares resultan de gran interés. Es deseable que dichas técnicas posean una gran capacidad para diferenciar entre cepas, para de esta manera asegurar el seguimiento de las mismas en el entorno de producción y almacenamiento del alimento. Como veremos a continuación, en el caso de las especies *Z. bailii* y *Z. rouxii* no está bien establecido qué técnica es la más adecuada para diferenciar a nivel de cepa. Por este motivo, antes de estudiar en qué punto de la fabricación de las frutas se encuentra el origen de contaminación por estas levaduras en los turrones alterados se llevó a cabo un estudio comparativo utilizando tres técnicas moleculares con la finalidad de obtener el mayor grado de diferenciación posible.

2.2.1. Estudio comparativo de métodos para la caracterización de cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii*.

Actualmente se dispone de un gran número de técnicas para la discriminación de cepas de levaduras. Sin embargo, la capacidad discriminatoria de las mismas puede variar de unas especies a otras. En el caso del género *Zygosaccharomyces*, existen pocos estudios que aborden la caracterización molecular de sus especies a nivel de cepa. Existen datos preliminares obtenidos en las especies *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. fermentati*, *Z. mellis* y *Z. rouxii* a partir de la aplicación del análisis de restricción del mtDNA (Guillamón y col., 1997) o en cepas de *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. fermentati* y *Z. rouxii* mediante la utilización de electroforesis de cromosomas (Török y col., 1993). Esteve-Zarzoso y colaboradores (2003) aplicaron la restricción de mtDNA con *Hinfl* a las 10 especies del género, sin embargo, aunque permitía la diferenciación de cepas dentro

de una misma especie, en la mayoría de casos los patrones eran muy similares, diferenciándose tan sólo por la presencia/ausencia de una banda. Por tanto, hasta el momento, no conocemos el método más óptimo para obtener un máxima resolución intraespecífica en el género *Zygosaccharomyces*. En el presente trabajo, se ha abordado un análisis de los polimorfismos genéticos a nivel intraespecífico de cepas de referencia obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Tabla 9). Para ello, se aplicaron tres técnicas moleculares (RAPD-PCR, amplificación de microsatélites y RFLP de DNA mitocondrial) cuya capacidad para discriminar a nivel de cepa ha sido descrita previamente para otras especies de levaduras (Pina y col., 2005; Baleiras Couto y col., 1996a, 1996b; Ibeas y col., 1996; Petersen y col., 2002).

A continuación, se describen los resultados obtenidos con cada una de las técnicas aplicadas a 13 cepas de referencia de *Z. bailii* (Tabla 20) y 21 de *Z. rouxii* (Tabla 21).

2.2.1.1. Análisis de polimorfismos del DNA mitocondrial.

Las cepas de referencia de *Z. bailii* y *Z. rouxii* se sometieron a análisis de restricción del mtDNA con las endonucleasas *Ddel*, *EcoRV*, *Hinfl*, *RsaI* y *TaqI*. De todas ellas, *Hinfl* fue la que proporcionó mayor variabilidad en ambas especies. Como se muestra en la Figura 6, los resultados fueron visualizados en geles de agarosa. El tamaño de los fragmentos se calculó con el marcador de DNA de fago λ digerido con *PstI*. Las digestiones con *Hinfl* dieron lugar a patrones moleculares con un número de bandas variable, entre 8 y 17, con tamaños entre 0,8 y 4,7 Kb. En la tablas 20 y 21 se resumen los diferentes patrones obtenidos con este enzima en todas las cepas de referencia de *Z. bailii* y *Z. rouxii* analizadas. La técnica proporcionó gran variabilidad, siendo mayor en *Z. bailii* que en *Z. rouxii*. Así, se determinaron 9 patrones diferentes en las 13 cepas de *Z. bailii* (que corresponde a un 69% de variabilidad) y 9 patrones en las 21 cepas de *Z. rouxii* analizadas (43%).

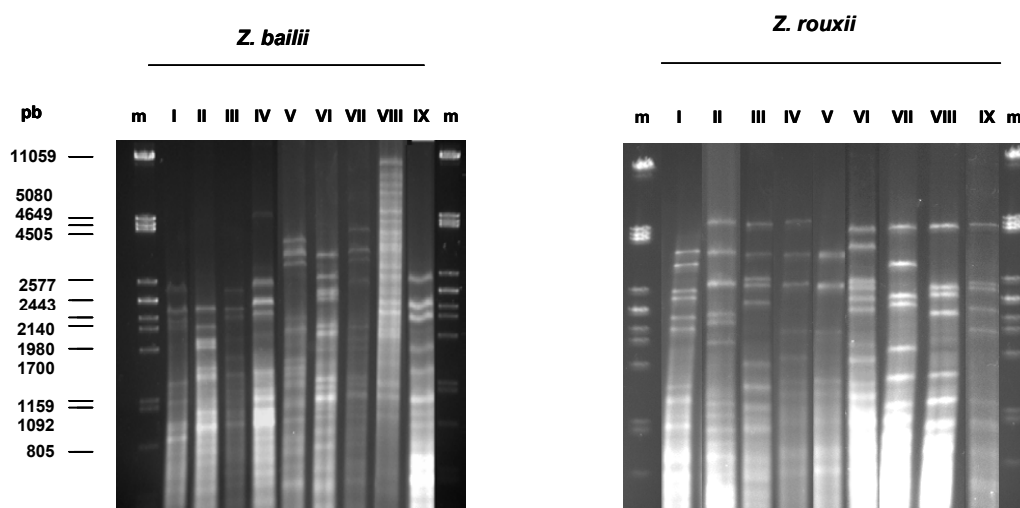


Figura 6. Patrones moleculares obtenidos mediante restricción del mtDNA con la endonucleasa *Hin*I en cepas de referencia de *Z. bailii* y *Z. rouxii*, descritas en la Tabla 20 y 21. (m) es el marcador DNA fago λ digerido con *Pst*I.

2.2.1.2. Amplificación de microsatélites.

Otra de las técnicas aplicadas fue la amplificación de microsatélites, que son secuencias de 2 a 10 pb repetidas en tándem a lo largo del genoma, hipervariables en longitud como consecuencia de errores en las replicación del DNA. Se utilizaron dos oligonucleótidos, (GTG)₅ y (GAC)₅ (Tabla 13), para la diferenciación de las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* de referencia, siguiendo el protocolo previamente descrito por Baleiras Couto y colaboradores (1996b). En la Figura 7 se muestra un ejemplo de algunos patrones obtenidos para cada una de las especies analizadas con ambos oligonucleótidos. Las amplificaciones generadas dieron lugar a patrones de 5 a 7 bandas, con un tamaño molecular que variaba entre 0,25 y 1,7 Kb aproximadamente.

Las tablas 20 y 21 también muestran los resultados obtenidos con la amplificación de microsatélites, que proporcionaron menor resolución que la restricción de mtDNA. Cuando se utilizó el oligonucleótido (GTG)₅, se observaron 4 patrones diferentes en las 13 cepas de *Z. bailii* (30% variabilidad), y 4 patrones en las 21 cepas de *Z. rouxii* (19% de variabilidad). Sin embargo, cuando se utilizó el oligonucleótido (GAC)₅, se obtuvo menos variabilidad, con tan sólo 3 patrones diferentes en *Z. bailii* y 1 patrón para *Z. rouxii*.

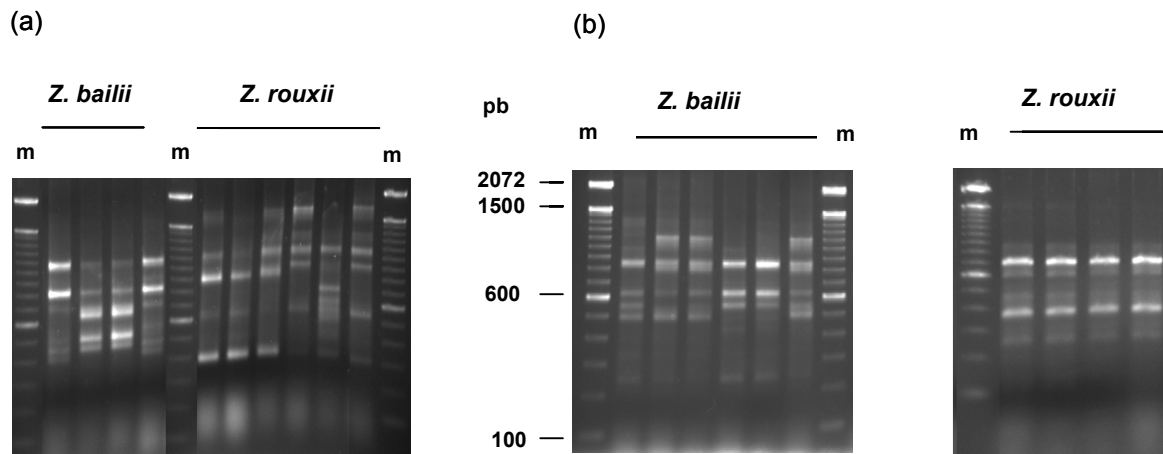


Figura 7. Ejemplo de patrones obtenidos tras la amplificación de microsatélites en cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* de referencia, con los oligonucleótidos (a) (GTG)₅, que proporcionó mayor variabilidad y (b) (GAC)₅, con el que se obtuvo un nivel de resolución muy bajo. De izda a dcha, en (a) cepas de *Z. bailii*: CECT 1931 (patrón B), CECT 1932 (patrón C), CECT 1933 (patrón C), CECT 1939 (patrón B); cepas de *Z. rouxii*: CECT 11941 (Patrón C), CECT 11923 (Patrón C), CECT 11930 (Patrón C), CECT 11928 (Patrón B), CECT 11926 (Patrón D), CECT 11929 (Patrón B); en (b) cepas de *Z. bailii*: CECT 11931 (Patrón B), CECT 11932 (Patrón C), CECT 11933 (Patrón C), CECT 11939 (Patrón A), CECT 11922 (Patrón A), CECT 11940 (Patrón C); cepas de *Z. rouxii*, todas con Patrón A: CECT 1230, CECT 1231, CECT 1232, CECT 10132. (m) es el marcador de 100 pb.

2.2.1.3. Amplificación mediante RAPD-PCR.

Tal y como se describe en el apartado 8.4.5 de Materiales y Métodos y con la finalidad de obtener el máximo grado de discriminación posible entre las cepas pertenecientes a las especies *Z. bailii* y *Z. rouxii*, se llevaron a cabo amplificaciones arbitrarias del DNA de ambas especies mediante RAPD-PCR. Para ello se utilizaron 9 oligonucleótidos de secuencia arbitraria (OPA 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 15 y 16) (Tabla 7), de forma que se pudiera determinar cuales proporcionaban mayor información en cuanto a variabilidad intraespecífica. Para valorar la reproducibilidad del ensayo de RAPD, cada reacción se realizó en 3 réplicas, utilizando DNA procedente de distintas extracciones y de cultivos independientes. Los resultados se analizaron en geles de agarosa, comparando las bandas de cada perfil con el marcador de tamaños moleculares de 100 pb. Cada uno de estos cebadores generó entre 3 y 8 bandas, de entre 0,4 y 2 Kb. En la Tabla 20 se detallan los patrones de RAPD obtenidos para las cepas de *Z. bailii* de colecciones de cultivo. Los distintos oligonucleótidos proporcionaron patrones diferentes, indicando que podían utilizarse para identificación de cepas. Así, el oligonucleótido OPA 3 reveló 2 patrones, los OPAs 2, 7, 8 y 9 dieron tres patrones cada uno, OPA 11 cuatro

patrones y OPA 10 y OPA 15 proporcionaron la mejor discriminación a nivel de cepa en esta especie, obteniéndose 5 patrones respectivamente. En la Figura 8a se muestran los perfiles obtenidos con los dos oligonucleótidos más resolutivos a nivel intraespecífico en *Z. bailii*, OPA 10 y 15.

Los resultados obtenidos en la caracterización de las 21 cepas de referencia de *Z. rouxii* se muestran en la Tabla 21. Los oligonucleótidos 2, 7, 8, 9, 11 y 16 dieron lugar a 2 patrones diferentes, OPA 10 a tres, OPA 15 proporcionó 4 patrones y finalmente OPA 3, que dio lugar a 7 patrones, fue el oligonucleótido más resolutivo en la discriminación de cepas de *Z. rouxii*. La Figura 8b muestra los perfiles de RAPD generados por el OPA 3 en la especie *Z. rouxii*.

Comparando el poder discriminatorio de las tres técnicas utilizadas, la amplificación de microsatélites y el ensayo RAPD aparecen como las técnicas que dan lugar a menor variabilidad, en comparación con el análisis de restricción del mtDNA con *HinfI*. En el caso del análisis de RAPD, la mayor variabilidad a nivel de cepa se obtuvo con OPA 10 y OPA 15 para *Z. bailii*, y OPA 3 para *Z. rouxii*. Por tanto, y de acuerdo con estos resultados, proponemos la combinación de análisis de RFLP de mtDNA con *HinfI* y análisis de RAPD con OPA 10 y OPA 15 como el mejor procedimiento para caracterizar cepas de *Z. bailii*, mientras que el análisis de restricción del mtDNA con *HinfI* y RAPD con OPA 3 serían más adecuados para la diferenciación de cepas de *Z. rouxii*.

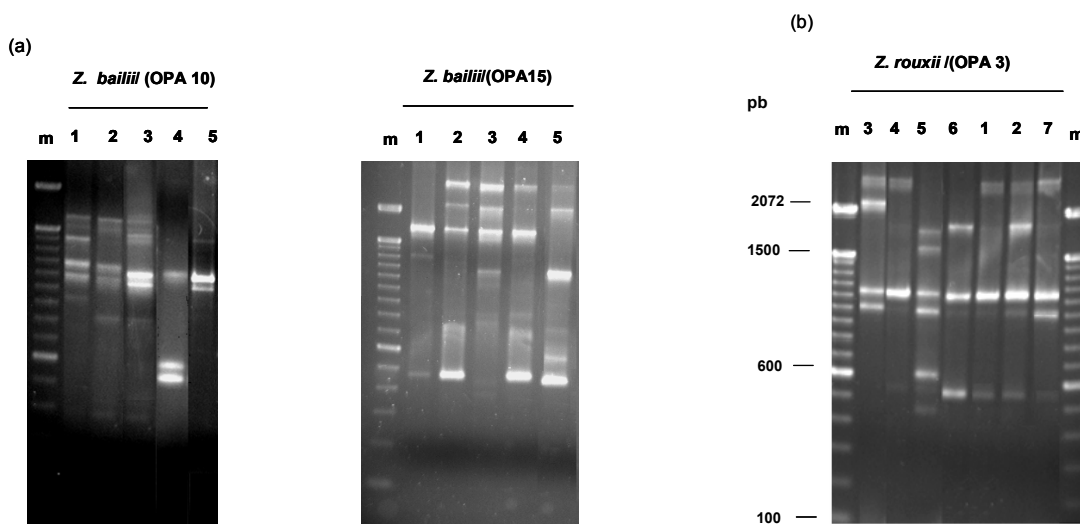


Figura 8. Perfiles de RAPD obtenidos con los oligonucleótidos más discriminantes, (a) OPA 10 y OPA 15 (*Z. bailii*) y (b) OPA 3 (*Z. rouxii*), y que se detallan en la Tabla 20 y 21. (m) es el marcador de 100 pb.

Tabla 20. Patrones obtenidos mediante restricción de mtDNA, PCR de microsatélites y RAPD en cepas de referencia de *Z. bailii*.

Designación CECT ^a	Origen de aislamiento	RFLP DNAMt	PCR microsatélites		RAPD								
		<i>Hinfl</i>	(GTG) ₅	(GAC) ₅	OPA 2	OPA 3	OPA 7	OPA 8	OPA 9	OPA 10	OPA 11	OPA 15	OPA 16
1898	Insecto, cerveza, Tokio	I	A	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1924	desconocido	I	A	B	1	1	1	1	1	1	1	2	1
11042	Mosto de uva	II	A	B	1	1	2	2	1	2	2	3	1
11043	Vino (turbio)	III	A	B	1	1	1	1	1	1	3	4	1
11352 ^b	desconocido	IV	A	B	2	1	1	1	1	1	3	2	1
11922	Zumo concentrado de naranja	VIII	D	A	1	1	2	2	1	3	3	2	1
11931	Mosto de pera	VII	B	B	1	1	1	1	1	1	3	2	1
11932	Zumo de manzana	V	C	C	3	2	1	3	2	4	4	5	1
11933	Mayonesa	V	C	C	3	2	1	3	3	4	3	5	1
11939	Mosto de uva	VI	B	A	1	1	3	2	1	2	2	3	1
11940	Miel	V	C	C	1	2	1	3	2	4	4	5	1
11952	Vino turbio	IX	A	B	1	1	1	2	1	5	3	2	1
11954	Mosto de uva	II	A	A	1	1	3	2	1	2	2	3	1

^a CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ^b Previamente clasificada como *Zygosaccharomyces bisporus*.

Tabla 21. Patrones obtenidos mediante restricción de mtDNA, PCR de microsatélites y RAPD en cepas de referencia de *Z. rouxii*.

Designación CECT ^a	Origen de aislamiento	RFLP DNAm ^t	PCR microsatélites		RAPD								
		<i>Hinf</i> I	(GTG) ₅	(GAC) ₅	OPA 2	OPA 3	OPA 7	OPA 8	OPA 9	OPA 10	OPA 11	OPA 15	OPA 16
1230	Miel	I	A	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1231	Bombón de sirope de naranja	I	B	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1232	Mosto concentrado de uva negra	II	B	A	1	1	1	2	2	1	1	2	1
10132	desconocido	III	B	A	1	2	1	1	2	2	1	1	1
10137	Pasa de Corinto	IV	B	A	1	1	1	2	2	1	1	1	1
10312	Pastel de higo	IV	B	A	1	1	1	2	2	1	1	1	1
10313	Higo seco	IV	B	A	1	1	1	2	2	1	1	1	1
10350	Higo seco	V	B	A	1	7	1	2	2	1	1	1	1
10377	<i>Phoenix dactilifera</i>	IV	B	A	1	1	1	1	2	1	1	1	1
10381	Melaza de caña de azúcar	VI	E	A	1	1	1	1	2	1	1	1	1
10427	Miel	IV	B	A	1	4	1	2	2	1	1	1	1
10445	Mermelada de ciruela fermentada	VII	B	A	1	3	1	2	2	1	1	2	1
10633	Miel	VIII	B	A	1	4	1	2	2	2	1	1	1
11149 ^{bc}	Uva	IX	B	A	1	7	1	2	2	1	1	2	1
11941	Salsa de soja	V	C	A	2	5	2	3	1	3	2	3	2
11923	Salsa de soja	V	C	A	2	5	2	3	1	3	2	4	2
11930	Salsa de soja	V	C	A	2	5	2	3	1	3	2	4	2
11928	Mosto concentrado de uva	II	B	A	1	2	1	2	2	1	1	1	1
11926	Mosto concentrado de uva	II	D	A	1	6	1	2	2	1	1	2	1
11929	Limonada	IV	B	A	1	1	1	2	2	1	1	1	1
11927	Mosto concentrado de uva	II	B	A	1	2	1	2	2	1	1	2	1

^a CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ^b Previamente clasificada como *Zygosaccharomyces mellis*; ^c Cepa tipo de *Z. polymorphus*.

2.2.2. Trazabilidad de cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* en la empresa de frutas confitadas.

Como se ha comentado anteriormente, una vez identificada la especie responsable de la alteración del turrón, interesaba conocer el origen de contaminación por cepas pertenecientes a dicha especie. La importante implicación de las especies *Z. bailii* y *Z. rouxii* en la contaminación de las frutas confitadas, utilizadas en la elaboración de los turrónes, nos llevó a la aplicación de técnicas moleculares que permitieran la diferenciación a nivel de cepa. Teniendo en cuenta estudios previos (Esteve-Zarzoso y col., 2003; Guillamón y col., 1997), y los resultados obtenidos en el apartado anterior con cepas de referencia, se decidió abordar el mismo análisis en las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* aisladas de distintos puntos de la cadena de producción de los turrónes alterados. Para ello, según los datos obtenidos en el apartado anterior, se aplicaron las técnicas que habían resultado más resolutivas para la diferenciación de cepas en cada especie. Así, se aplicó el análisis de restricción del mtDNA con *Hinfl* a ambas especies, y la amplificación mediante RAPD-PCR con OPA 10 y OPA 15, para caracterizar las levaduras de la especie *Z. bailii*. En el caso de los aislados identificados como *Z. rouxii*, la técnica de RAPD se realizó con el OPA 3.

Los resultados de este análisis mostraron que el total de 90 cepas de *Z. bailii* aisladas de las frutas confitadas, jarabes y turrón, compartían un patrón único cuando se aplicaba el análisis de restricción del mtDNA (Figura 9). De la misma forma, se obtuvo un único patrón para los 85 aislados de *Z. rouxii* analizados (Figura 9).

La técnica de RAPD con OPA 3 evidenció la presencia de dos patrones distintos, A y B, en los aislados de *Z. rouxii* (Figura 10), mientras que la aplicación de los OPAs 10 y 15 mostró un único patrón en todos los aislados de *Z. bailii* analizados (Figura 10). Los patrones A y B de RAPD se pudieron observar en cepas de *Z. rouxii* distribuidas en toda la cadena de producción de las frutas confitadas, tanto en las piezas de fruta como en los jarabes. Por otra parte, la única cepa de *Z. bailii* (con patrón único obtenido mediante restricción de mtDNA y RAPD con OPA 10 y 15), se encontraba distribuida en diversas muestras de fruta confitada y jarabe en la empresa productora de dichas frutas. Además, la cepa presente en la fruta del turrón alterado mostró este mismo patrón.

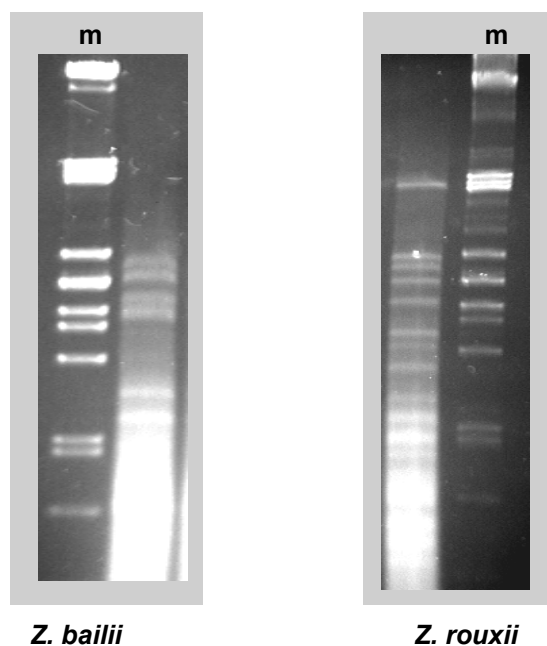


Figura 9. Ejemplos de patrones de restricción de mtDNA con *HinfI* que mostraron las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii*, aisladas de las frutas confitadas y de turrón alterados. La línea m corresponde al marcador de tamaños moleculares: DNA de fago λ digerido con *PstI*.

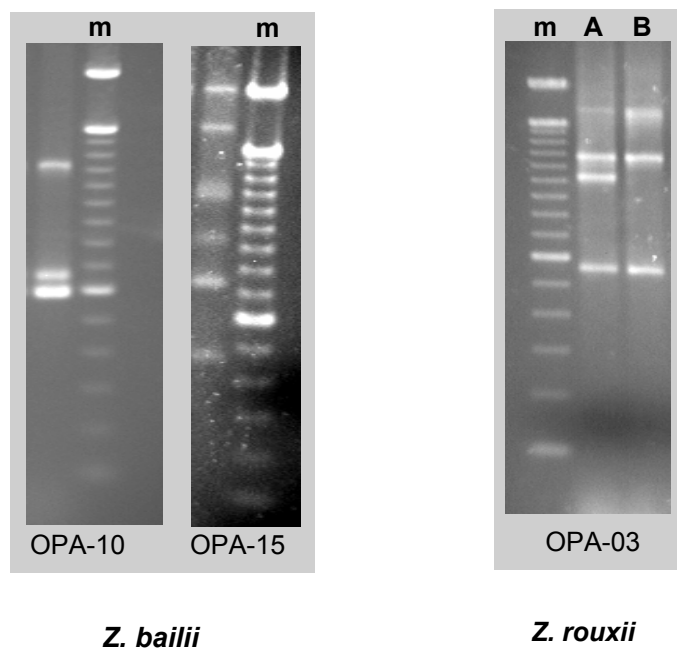


Figura 10. Ejemplos de patrones de RAPD que mostraron las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* aisladas de frutas confitadas y turrón alterado. La línea m corresponde al marcador de 100 pb.

2.3. Discusión.

Hasta hace poco, la contaminación de los alimentos por levaduras no era considerada como un inconveniente importante en la industria alimentaria. Como consecuencia del aumento considerable en la escala de producción de alimentos y bebidas, de la utilización de tecnologías más modernas de procesado, de la gran variedad de nuevas formulaciones y de la tendencia a reducir el uso de conservantes, la alteración por levaduras se ha convertido en un problema serio para las industrias de alimentos (Loureiro y Querol, 1999; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; van der Vossen y Hofstra, 1996).

La detección y el seguimiento de cepas de levaduras alterantes de forma rutinaria, podría ser de gran utilidad para resolver problemas de contaminación en la industria, y por tanto, evitar pérdidas económicas. El presente trabajo constituye un ejemplo de la aplicación de técnicas moleculares de identificación y caracterización para resolver un problema de alteración por levaduras a nivel industrial. En concreto, la alteración de un turrón de frutas confitadas que tuvo como efectos negativos el abombamiento y rotura de los envases como resultado de la producción de gas por parte de los microorganismos alterantes. En un caso de alteración microbiana, el primer aspecto a tener en cuenta es el referente a la identificación del microorganismo responsable de dicha alteración. Puesto que el turrón objeto de estudio se compone de una mezcla de mazapán y frutas confitadas, fue necesario aislar los microorganismos presentes en ambos ingredientes. En concreto, se aisló una levadura a partir de las muestras de fruta y un hongo filamentoso a partir del mazapán. La levadura fue identificada como *Z. bailii* por la técnica de análisis de restricción de la región ribosomal 5,8S-ITS, y el hongo filamentoso como *N. mauritiicola* mediante la secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S rRNA. Puesto que *N. mauritiicola* es un hongo típicamente fitopatógeno, estos datos estaban indicando que nos encontrábamos ante un caso típico de alteración por una levadura, en concreto la especie *Z. bailii* cuya capacidad fermentativa y habilidad para crecer en alimentos con baja a_w y alto contenido de azúcar es bien conocida (Tokuoka, 1993).

Puesto que las frutas contenidas en el turrón procedían de una empresa distinta a la del turrón, procedimos al aislamiento e identificación de las levaduras presentes en la empresa que elaboró dichas frutas, para confirmar la presencia de la especie *Z. bailii* en dicha empresa. Efectivamente, se identificó la presencia de esta levadura en distintas muestras de jarabe y fruta confitada a lo largo de la cadena de producción de dichas frutas, e incluso en concentraciones muy elevadas en algunos casos.

Además, se identificaron las especies de levadura *Z. rouxii*, *D. hansenii* y *S. roseus* en distintos puntos de la empresa. Las especies *S. roseus* y *D. hansenii* se describen como levaduras xerotolerantes (Jermini y col., 1987; Tilbury, 1980a; Tokuoka y col., 1985), pudiendo crecer en jarabes y frutas confitadas y producir alteración. Sin embargo, *S. roseus* es una especie no fermentativa y *D. hansenii* presenta una fermentación de la glucosa débil o ausente (Kurtzman y Fell, 1998), por lo que a pesar de estar presentes en la empresa de las frutas no suponen un riesgo potencial para la empresa del turrón en lo que se refiere al abombamiento y rotura de envases. La presencia de *S. roseus*, aunque esporádica en distintas muestras de la fábrica indicaría una falta de higiene en todo el proceso de elaboración, que podrían dar lugar a la formación de colonias rosas en la superficie de las frutas. La identificación de *Z. rouxii* en muestras tomadas durante la fabricación y almacenamiento de las frutas confitadas es destacable, ya que se trata de una especie osmotolerante, y por tanto típica de alimentos con baja a_w (Tokuoka, 1993). Así, fue la única especie observada en muestras de naranja, y responsable de la fermentación de uno de los jarabes de cereza utilizado en la elaboración de cereza confitada. Aunque no se aisló en el turrón alterado, su presencia en la fábrica de frutas ha de tenerse en cuenta ya que podría ser fuente de contaminación y alteración de turrones con los mismos efectos que en el caso que nos ocupa.

Desde un punto de vista industrial, además de la identificación del agente causal de la alteración, la determinación del origen de la contaminación es de gran relevancia pues permite a la empresa adoptar medidas correctoras. Para tal fin, es necesario realizar una discriminación rápida a nivel intraespecífico.

En el presente estudio, se ha analizado la capacidad de tres técnicas moleculares (RFLP mtDNA, RAPD-PCR y amplificación de microsatélites) para diferenciar cepas de referencia pertenecientes a la especie que causó la alteración (*Z. bailii*). El estudio se extendió igualmente a la especie *Z. rouxii*, por su interés para la industria de turrón debido a su potencialidad como alterante, y así proporcionar herramientas para su diferenciación a nivel de cepa. Aquellas técnicas que proporcionaron un mayor poder discriminatorio (RFLP de mtDNA y RAPD), se aplicaron para la caracterización de cepas de *Zygosaccharomyces* aisladas de distintos puntos de la cadena de producción de frutas confitadas, así como de muestras almacenadas. En la cadena de producción, se determinó la presencia de una cepa de *Z. bailii* y 2 cepas de *Z. rouxii*, en el momento del muestreo. Dichas cepas estaban presentes de forma permanente en la fábrica, encontrándose tanto en muestras obtenidas durante la fabricación como en muestras almacenadas. La cepa de *Z. bailii* aislada en la fábrica y en el turrón alterado resultaron ser idénticas indicando por tanto que el foco de la contaminación que causó la alteración

Capítulo 2

se encontraba en la empresa que elaboró las frutas confitadas. La cepa alterante estaba presente a concentraciones elevadas en los jarabes los cuales son continuamente reutilizados. *Z. rouxii* estaba igualmente presente en jarabes. La humedad relativa que contienen los jarabes así como los cambios de temperatura, favorecen un crecimiento más rápido de las levaduras (Stratford, 2005). Esto indica que los jarabes son un foco importante de contaminación por levaduras en la cadena de producción de las frutas confitadas y por tanto, periodos largos de almacenamiento de las frutas en su propio jarabe no son recomendables (Martorell y col., 2005b).

Este estudio, muestra cómo los métodos moleculares de identificación y caracterización de levaduras pueden aplicarse para resolver un problema industrial de alteración al determinar el agente causal de la misma, así como el origen de la contaminación. Así, al establecer las herramientas idóneas para la diferenciación de cepas de una misma especie, se ofrece a las empresas la posibilidad de monitorizar la cadena de producción alimentaria, evitando importantes pérdidas económicas, así como conflictos entre productores y distribuidores o consumidores.

Capítulo 3: Caracterización fisiológica de cepas alterantes de *Zygosaccharomyces bailii* y *Z. rouxii* aisladas de alimentos con alta concentración de azúcares

El control de la alteración de alimentos debida a la actividad de las levaduras, es uno de los aspectos más importantes en los programas de conservación alimentaria. Parámetros tales como la temperatura, adición de conservantes y pH son utilizados para inhibir o destruir las levaduras, y en general, los microorganismos (Marechal y col., 1999). La aplicación de conservantes alimentarios es una práctica realizada durante siglos. Algunos, como los aceites esenciales, son sustancias de origen natural (Conner y Beuchat, 1984; Moleyar y Narasimham, 1992), y se han utilizado para inhibir levaduras de diversas especies alterantes, como *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranaefaciens*, *Dekkera anomala*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae* (Araujo y col., 2003). Otros conservantes son los ácidos orgánicos débiles (sorbico, benzoico o acético), que frecuentemente se encuentran de forma natural en algunos alimentos (frutas y hortalizas). Estos conservantes se utilizan habitualmente en alimentos de pH bajo, incluyendo zumos de frutas, refrescos, vino y salsas, cuya alteración está frecuentemente causada por levaduras, hongos filamentosos y bacterias acéticas (Beuchat, 1982). Las resistencias que muestran las levaduras frente a estos conservantes químicos está suponiendo un problema en la industria alimentaria, ya que producen un incremento en los niveles de conservantes aplicados (Piper y col., 2001). Además, determinadas prácticas en el procesado y almacenamiento de algunos alimentos están ocasionando un incremento de las incidencias de alteración por levaduras, ya que algunas de ellas son tolerantes a pH bajos y pueden crecer en condiciones de baja a_w (levaduras osmotolerantes o xerotolerantes) (Tilbury, 1980a, 1980b).

En el capítulo anterior se muestra la implicación de dos especies de levadura, *Z. bailii* y *Z. rouxii*, en la alteración de turrón de frutas confitadas, así como la utilidad de las técnicas moleculares para el establecer el origen de contaminación en la cadena de producción. Ambas especies pudieron aislarse de frutas confitadas y jarabes con un elevado contenido en azúcar, lo que revela su elevada osmotolerancia. Sin embargo, datos previos en la bibliografía muestran que *Z. bailii* presenta una osmotolerancia más moderada en comparación con *Z. rouxii*, y que no puede crecer por debajo de a_w de 0,85 (Jermini y Schmidt-Lorentz, 1987). Por otra parte, el suceso de alteración en los turrones, y que obligó a su retirada del mercado, muestra la necesidad de aplicar nuevas medidas de conservación que aseguren su estabilidad. Teniendo en cuenta que determinados rasgos fisiológicos, así como la tolerancia y adaptación a condiciones extremas, son responsables de la capacidad alterante de estas levaduras, consideramos de gran interés evaluar dichos aspectos en cuatro cepas aisladas de la cadena de producción de dichos turrones : 2 cepas de *Z. bailii* (CECT 12001 y CECT 12002) y 2 de *Z. rouxii* (CECT 12003

y CECT 12004). Además, a modo comparativo, se han incluido otras especies alterantes que fueron aisladas de distintos alimentos y bebidas (Tabla 11).

3.1. Características fisiológicas.

3.1.1. Crecimiento a 4 y 37°C.

Se analizó la capacidad de crecimiento a temperaturas de 4 y 37°C. El crecimiento a 37°C es una característica típica de algunas levaduras presentes en hábitats restringidos y específicos (determinadas especies de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* o *Saccharomyces*) (Deák y Beuchat, 1996; Kurtzman y Fell, 1998), siendo más común en bacterias patógenas. En este ensayo, esta capacidad sólo se observó en la cepa de *Pichia guilliermondii* (395). Además, entre las cepas de *Z. bailii* analizadas, únicamente las cepas CECT 12001 y CECT 12002, aisladas de jarabe y turrón de frutas confitadas, desarrollaron crecimiento a 37°C, mientras que las otras cepas de *Z. bailii* (592, 593, 594), no mostraron esta capacidad. Por otra parte, se evaluó el crecimiento de las cepas de levadura a 4°C, ya que es un factor importante a considerar en alimentos conservados en frío o en congelación. Las temperaturas frías suponen un factor limitante para el crecimiento de la mayoría de las levaduras alterantes típicas. Sin embargo algunas especies, mayoritariamente basidiomicetos y no fermentativos, pueden crecer a bajas temperaturas (Davenport, 1980b). En el caso de las cepas analizadas en este estudio no se observó crecimiento a 4°C, con la excepción de las cepas *Z. lentus* (398) y *P. guilliermondii* (395), que sí mostraron esta característica. Estudios previos han mostrado que la adaptación de las levaduras a bajas temperaturas se debe a cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana, produciéndose un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados (Watson, 1987). Esta característica indicaría que dichas cepas presentan un potencial para la alteración de productos conservados en frío, como refrescos, zumos de frutas y salsas, una capacidad que únicamente se había descrito en la especie *Z. lentus* (Steels y col., 1999).

De acuerdo con estos datos, no todas las cepas pertenecientes a la misma especie han mostrado la misma capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas. Esto es destacable en el caso de la capacidad de crecimiento a 37°C de las cepas de *Z. bailii* CECT 12001 y CECT 12002.

3.1.2. Crecimiento a pH bajo.

En general, el pH de los alimentos y bebidas tiene un rango entre 2,5 y 7,5. En concreto, los alimentos ácidos (refrescos, sidra, zumos de frutas, jarabes) están asociados a la alteración por levaduras, debido a su capacidad de crecimiento a pH 2.

En este estudio, todas las cepas analizadas presentaron la capacidad para crecer en medios a pH muy bajo. Así, *Z. lentus* (398) y *P. guilliermondii* (395) crecieron a pH 1,9, las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* fueron tolerantes a pH 2,2 y *Candida magnoliae* (397), la cepa más resistente, creció a pH 1,75 (Tabla 22). Estos resultados explicarían la presencia de estas cepas en alimentos acidificados, como zumos de frutas, salsa, mermeladas, frutas confitadas y refrescos, y por tanto su capacidad para alterarlos.

3.1.3. Producción de gas.

El signo más visible de alteración por levaduras es la producción de exceso de gas, dando lugar no sólo a la pérdida de las propiedades del alimento, sino también a la deformación de recipientes o “tetrapaks”, rotura de latas o en casos extremos, a la explosión de botellas de vidrio. El exceso de producción de gas por las levaduras es el resultado de la fermentación de azúcares que, dependiendo de la especie de levadura, dará lugar a un volumen de gas variable y por tanto a la presión formada. Por ello, en el presente ensayo, se ha evaluado la capacidad de las cepas de levadura para formar gas a partir de la fermentación de glucosa añadida en distintas concentraciones al medio de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Se determinaron volúmenes de gas bastante similares en todas las cepas crecidas en medio YDP (2% de glucosa) a 25°C. Sin embargo, cuando las cepas fueron cultivadas en medio YPD con 18 % de glucosa se observaron algunas diferencias. Así, *Z. lentus*, y las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* mostraron una elevada producción de gas (Tabla 22), en comparación con *P. guilliermondii*, *C. halophila* y *C. magnoliae*. Además, se determinó que, entre todas las cepas de *Z. bailii* analizadas, las cepas CECT 12001 y CECT 12002 (aisladas de jarabe y turrón) producían elevados volúmenes de gas, 190 y 186 mL respectivamente (Tabla 22). Estos resultados, muestran la elevada capacidad fermentativa de estas cepas en medios con elevado contenido en azúcar. Además, se confirma así que ambas cepas son las responsables de la alteración de los turrónes por fermentación de las frutas confitadas que contenían (tal y como se concluye en el capítulo anterior).

Capítulo 3

Tabla 22. Osmotolerancia, crecimiento a bajo pH, producción de gas y temperatura de inhibición del crecimiento de las cepas analizadas en este estudio.

Cepas ^a	Glucosa (M)	Min. pH	T.I. (°C)	Producción de gas ^b (mL)	Producción de gas ^c (mL)
<i>Zygosaccharomyces lentus</i> , 398	3,75	1,9	48	29	170
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , 594	3,9	2	48,5	30	118
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , CECT 12001	4	2,2	52,5	29	190
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , CECT 12002	4,05	2,2	52,5	30	186
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , 593	4	2,15	52,5	30	111
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , 592	4,25	2,2	52,5	20	133
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , CECT 12003	>5	2,2	47,5	31,5	28
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , CECT 12004	>5	2,2	46,5	31,5	102
<i>Pichia guilliermondii</i> , 395	3,2	1,95	46,5	26	16
<i>Candida halophila</i> , 396	4,4	2,6	43	28	98
<i>Candida magnoliae</i> , 397	4,75	1,75	51	30	48

T.I. Temperatura de inhibición del crecimiento. ^a Las levaduras se incubaron a 25 °C; ^b En medio YPD con 2% de glucosa; ^c En medio YPD con 18% de glucosa.

3.2. Tolerancia y adaptación a condiciones extremas.

3.2.1. Temperatura inhibitoria del crecimiento.

El tratamiento térmico es uno de los métodos más efectivos y comunes para la conservación de alimentos y bebidas. Por ello, se ha analizado la temperatura mínima inhibitoria (T.M.I.) del crecimiento de las cepas incluidas en el estudio.

En general, cuando se determinó la T.M.I. del crecimiento en medio YPD se observó una resistencia térmica moderada en todas las cepas. Se determinó que las cepas de *Z. bailii* eran más termoresistentes que las otras especies, tolerando temperaturas de 52,5°C (Tabla 22). *Candida magnoliae* resistió tratamientos térmicos de 51°C, mientras que *C. halophila* creció hasta temperaturas de 43°C. El crecimiento de las cepas de *Z. rouxii*, *P. guilliermondii* y *Z. lentus* se inhibió aproximadamente a 47°C.

Por otra parte, algunos solutos incluidos en los medios de cultivo o que están presentes en el alimento pueden modificar la temperatura óptima del crecimiento de la levadura o su tolerancia a tratamientos térmicos. Por tanto, para analizar la influencia de la glucosa en la resistencia de la levadura a la temperatura, se determinó la T.M.I. del

crecimiento de la cepa *Z. bailii* CECT 12002, utilizando medios con concentraciones crecientes de glucosa (hasta 5 M). Se observó que esta cepa resistía hasta 70°C, especialmente cuando se cultivó en medios que contenían entre 3-3,5 M de glucosa (Tabla 23). Este resultado mostró el efecto protector que tiene la glucosa sobre las células, ya que esta cepa había incrementado la temperatura inhibitoria del crecimiento desde 52,5°C (en medio YPD con glucosa 0,1 M) a 70°C (en medio YPD con glucosa 3,5M). Además, tal y como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos, el tratamiento térmico se aplicó en distintos tiempos de la fase de crecimiento de la levadura, tras 10 min y 4 h de la inoculación. Según lo observado, cuando el tratamiento térmico se aplicó a los 10 min de la inoculación, las células en fase estacionaria eran más resistentes al “shock” térmico”. Sin embargo, cuando el tratamiento se aplicó una vez transcurridas 4 horas desde la inoculación, las células (que estaban en fase exponencial de crecimiento) eran más sensibles al “shock” térmico.

Tabla 23. Temperatura de inhibición del crecimiento de la cepa *Z. bailii* CECT 12002, en medios con concentraciones crecientes de glucosa.

A los 10 min. de la inoculación		A las 4 h de la inoculación	
Glucosa (M)	T ^a de inhibición (°C)	Glucosa (M)	T ^a de inhibición (°C)
0-0,75	50	0-1,5	50
1-2,75	55	1,75-4	55
3-4,25	60-70	4,25-5	n.c ^a
4,5-5	n.c ^a		

^a No se obtuvo crecimiento

3.2.2. Osmotolerancia.

Todas las cepas analizadas fueron capaces de crecer en medio que contenía hasta 60% p/v de glucosa, por lo que podrían considerarse como osmotolerantes (Tilbury, 1980a, 1980b). Fueron necesarias 2 semanas para obtener crecimiento, y tras 4 semanas, se determinó la concentración mínima de glucosa inhibitoria (C.M.I.) del crecimiento de las levaduras. Las cepas CECT 12003 y CECT 12004, pertenecientes a la especie *Z. rouxii*, fueron las más osmotolerantes, pudiendo crecer en medios con 5 M de glucosa (90% p/ v) (Tabla 22). Las cepas de *Z. bailii* toleraron hasta 4 M de glucosa (72%

p/v), mostrando así una elevada osmotolerancia. Además, las dos cepas pertenecientes al género *Candida*, 396 y 397, mostraron también una elevada resistencia a glucosa, creciendo en medios con 4,75 M de glucosa (85,5% p/v). La cepa de *Pichia guilliermondii* fue más sensible a glucosa, creciendo hasta 3,2 M (57,6% p/v).

3.2.3. Adaptación a glucosa.

Se analizó la capacidad de adaptación a medios con altas concentraciones de glucosa de las cepas incluidas en el estudio, como mecanismo de adaptación de las levaduras alterantes a condiciones ambientales extremas.

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo. Tras 3 semanas de incubación en medios con concentraciones crecientes de glucosa, todas las cepas de *Z. bailii* mostraron una C.M.I. de 4 M, en medio YPD a pH 4. Tras la adaptación, la C.M.I. se incrementó, y algunas cepas fueron capaces de crecer en medios hasta con 4,5 y 5 M de glucosa. La cepa de *Z. lentus* (398), incrementó la C.M.I. hasta 4,3 M (ver Figura 11), mientras que la cepa de *Z. rouxii* CECT 12003 se adaptó hasta concentraciones de glucosa de 5,5 M. Finalmente, *Pichia guilliermondii* (395) mostró también capacidad de adaptación a glucosa, incrementando la C.M.I. de 3,15 a 4,6 M. No se pudo determinar adaptación a glucosa en el caso de las cepas de *C. magnoliae* y *C. halophila*.

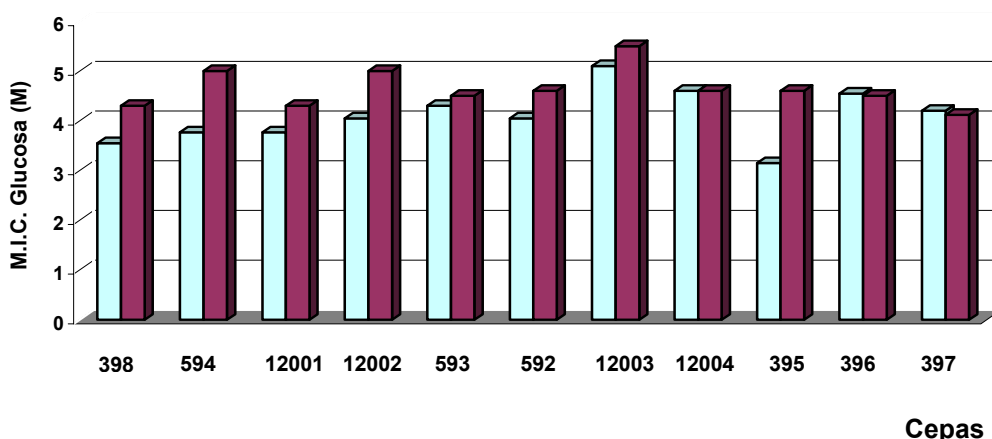


Figura 11. Crecimiento de levaduras adaptadas (rojo) y no adaptadas (azul) en YPD con glucosa, pH 4 a 25°C. Las levaduras son: *Z. lentus* 398, *Z. bailii* (594, 12001, 12002, 593, 592), *Z. rouxii* (12003, 12004), *P. guilliermondii* 395, *C. halophila* 396 y *C. magnoliae* 397.

3.3. Tolerancia a conservantes alimentarios.

Se analizó la capacidad de resistencia de las cepas de levadura a distintos compuestos que habitualmente se utilizan en la industria alimentaria como conservantes o desinfectantes (Tabla 14). Se determinó la C.M.I. de cada compuesto obtenida para cada cepa en medio YPD a pH 4. Se observó que todas las cepas de *Z. bailii* presentaban una elevada resistencia a la mayoría de compuestos analizados (Tabla 24). Así, estas cepas fueron muy tolerantes a ácido sórbico, ácido benzoico, ácido acético, ácido cinámico, etanol y dimetildicarbonato (DMDC). Específicamente, las cepas aisladas de jarabe y turrón de frutas confitadas, CECT 12001 y CECT 12002, fueron las más resistentes a ácido sórbico (8,15 mM), ácido acético (510 mM), etanol (1,95 M) y SO₂ (4,8 mM). Ambas cepas mostraron un comportamiento similar en cuanto a tolerancia a conservantes, lo que está en concordancia con estudios previos que, mostraron mediante técnicas moleculares que se trataba de la misma cepa (Martorell y col., 2005b).

La cepa de *Z. lentus* creció en medio YPD con 6,3 mM de ácido sórbico, 3,6 mM de ácido benzoico, 2,25 mM de ácido cinámico y 4,8 mM de sulfito sódico, mostrando así una elevada tolerancia a estos conservantes. Las otras especies incluidas fueron menos resistentes, y únicamente *Z. rouxii* (CECT 12003) y la cepa de *C. magnoliae* presentaron elevada tolerancia al ácido benzoico (Tabla 24). Además, es importante destacar la capacidad de *P. guillermondii* y *C. magnoliae* para crecer en medios que contenían hasta 1,9 mM de DMDC. Las cepas CECT 12003 y CECT 12004 pertenecientes a la especie *Z. rouxii* y que se aislaron de jarabe alterado, mostraron varias diferencias en cuanto a la resistencia a algunos conservantes: ácido benzoico, ácido cinámico y sulfito sódico.

Finalmente, en cuanto a la resistencia a desinfectantes, se determinó que las dos cepas de *Candida*, 396 y 397, eran resistentes al ácido peracético (Tabla 24), mientras que sólo la especie *Candida magnoliae* fue tolerante a elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la resistencia a hipoclorito sódico.

Tabla 24. Concentración mínima inhibitoria de los conservantes y desinfectantes analizados en este estudio. Las levaduras fueron crecidas en YPD, pH 4 a 25°C.

Cepas	Ácido sórbico mM	Ácido benzoico mM	Ácido acético mM	Ácido cinámico mM	Etanol M	SO ₂ mM	DMDC mM	Ácido peracético mM	Hipoclorito sódico mM	H ₂ O ₂ mM
<i>Z.lentus</i> , 398	6,3	>3,6	280	2,25	0,91	4,8	1,2	5	3	4
<i>Z. bailii</i> , 594	> 9,0	3,6	370	3,05	1,8	2,2	>1,9	3	2,25	5
<i>Z. bailii</i> , CECT 12001	8,15	3,6	510	2,45	1,95	>4,8	>1,9	5	2,5	11
<i>Z. bailii</i> , CECT 12002	7,65	3,35	490	2,5	1,95	>4,8	>1,9	5,25	2,7	12,5
<i>Z. bailii</i> , 593	7,3	2,75	450	2	1,9	1,7	>1,9	4,25	3,5	10
<i>Z. bailii</i> , 592	8,2	3,1	555	2,1	>2	1,1	1,8	5,5	2,5	10
<i>Z. rouxii</i> , CECT 12003	2,85	>3,6	110	>1,1	1,6	3,4	1,7	3,25	2,75	13,5
<i>Z. rouxii</i> , CECT 12004	2,8	3,05	106	0,91	1,7	4,1	1,7	3,25	2,55	16
<i>P. guilliermondii</i> , 395	1,35	1,1	67,5	0,35	1,15	2,6	>1,9	3,1	3,1	12
<i>C. halophila</i> , 396	1,1	2,4	82,5	0,27	1,15	0,4	0,52	7,8	2,5	6
<i>C. magnoliae</i> , 397	2,85	>3,6	>165	>1,1	1,35	4,1	>1,9	9	2,5	>24

3.4. Discusión.

Un gran número de levaduras descritas hasta el momento están asociadas a alimentos y bebidas (Kurtzman y Fell, 1998), sin embargo muy pocas especies son responsables de su alteración (Pitt y Hocking, 1997). Para la industria alimentaria, las especies del género *Zygosaccharomyces* son muy problemáticas (James y Stratford, 2003). En concreto las especies *Z. bailii* y *Z. rouxii* se caracterizan por su resistencia a conservantes como los ácidos orgánicos débiles, su extrema osmotolerancia y su capacidad para fermentar azúcares de tipo hexosa (Thomas y Davenport, 1985). Es por ello que son frecuentes alterantes de alimentos como zumos de frutas, refrescos, jarabes, miel y salsas.

En el capítulo anterior, se describe un caso concreto de alteración por estas levaduras en turrón elaborado con frutas confitadas. La aplicación de la técnica de secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S rRNA, nos permitió identificar cuatro especies de levadura, siendo *Z. rouxii* y *Z. bailii* las más frecuentes a lo largo de la cadena de producción de las frutas. Además, se aplicaron distintas técnicas moleculares para determinar las cepas responsables de la alteración del turrón, así como las rutas de contaminación durante el proceso de elaboración. De esta forma, se determinó un único patrón genético en los aislados de *Z. bailii*, y dos patrones distintos en las cepas de *Z. rouxii* (Figuras 4 y 5). Con el objetivo de conocer su potencial como alterantes, se ha evaluado el comportamiento fisiológico de dos cepas de *Z. bailii* (CECT 12001 y CECT 12002) y dos de *Z. rouxii* (CECT 12003 y CECT 12004; con patrones moleculares A y B respectivamente), que fueron aisladas de jarabe fermentado y de turrón alterado (Tabla 19). Además, en el análisis se incluyeron otras levaduras alterantes, *Z. lentus*, *Pichia guilliermondii*, *Candida halophila* y *Candida magnoliae*, para analizar si existen diferencias significativas en cuanto a su comportamiento fisiológico en diferentes condiciones extremas de crecimiento.

Se considera que los alimentos que contienen más de > 30% p/v de azúcar tienen un efecto antimicrobiano, aunque las levaduras crecen normalmente hasta un 45% p/v. Sin embargo, algunas levaduras pueden crecer y alterar alimentos con más de >67% p/v de azúcar, considerándose así osmotolerantes (si crecen a >50% p/v, 0,88 a_w) u osmófilicas (si crecen a un 60% p/v de azúcar) (Stratford, 2005). En este estudio, se ha mostrado la osmotolerancia de todas las cepas analizadas cuando éstas se cultivaron previamente en medios con glucosa. En concreto, las cepas de *Z. rouxii* mostraron la más elevada osmotolerancia, en concordancia con descripciones previas que muestran que esta especie puede crecer a a_w de 0,65 en sacarosa/glicerol (Barnett 2000; Thomas y

Davenport, 1985; Tilbury, 1980a, 1980b). Las cepas de *Z. rouxii* CECT 12003 y CECT 12004, fueron extremadamente osmotolerantes, capaces de crecer en medios con glucosa hasta 5 M (aproximadamente 90% p/v). Por otra parte, las levaduras pertenecientes a *Z. baillii* se describen como osmotolerantes moderadas en comparación con *Z. rouxii*, y no crecen por debajo de a_w de 0,80 (James y Stratford, 2003). Sin embargo, en este estudio se observó que las cepas de *Z. baillii* CECT 12001 y CECT 12002, podían crecer en medio con 4 M de glucosa (72% p/v), incluso se adaptaron a medios con un contenido en glucosa de 5 M. Por tanto, estas cepas podrían considerarse como levaduras osmofílicas, ya que son capaces de crecer a más de un 60% p/v de glucosa (Stratford, 2005). La elevada osmotolerancia que mostraron estas cepas podría explicar así su presencia en alimentos con tan elevado contenido en azúcar, como las frutas confitadas y el turrón (que pueden contener hasta 67% p/v glucosa). Finalmente, de todas las cepas analizadas, destacó la capacidad de *Candida magnoliae* para crecer en medios con un contenido en glucosa de hasta 85,5% p/v, lo que apoya datos previos que sugieren la elevada osmotolerancia de algunas especies del género *Candida* (Stratford y col., 2002; Stratford y James, 2003).

Otra característica que contribuye a la capacidad alterante de las levaduras del género *Zygosaccharomyces* es la posibilidad fermentar de forma vigorosa los azúcares de tipo hexosa, como la glucosa y la fructosa (Pitt y Hocking, 1997; Thomas y Davenport, 1985). En este estudio, se observó que las cepas de *Z. baillii*, *Z. rouxii* y *Z. lentus* producían una elevada cantidad de gas por la fermentación de glucosa presente en el medio de cultivo. Especialmente, las cepas de *Z. baillii* CECT 12001 y CECT 12002, aisladas de jarabe alterado y fruta confitada, dieron lugar a los valores más elevados en cuanto a producción de gas, lo que muestra su elevado potencial como alterantes de alimentos azucarados. Además, ambas cepas crecieron inusualmente a 37°C, una capacidad sólo descrita en la especie *Z. fermentati* dentro del género *Zygosaccharomyces* (Kurtzman, 1998). Adicionalmente, tras la aplicación de tratamientos térmicos utilizando medios con concentraciones crecientes de glucosa, se observó un aumento de la termoresistencia de *Z. baillii*. Se pudo determinar que la cepa *Z. baillii* (CECT 12002) incrementaba su resistencia a altas temperaturas (entre 60y 70°C) cuando se utilizaban medios con mayores concentraciones de glucosa (entre 3 y 3,5 M). Además, las células en fase de crecimiento exponencial mostraron mayor sensibilidad al tratamiento térmico. Estos resultados están en concordancia con datos aportados por otros autores, que sugieren que la glucosa actúa protegiendo las células de temperaturas extremas (Gibson, 1973; Iwahashi, 1995). Los tratamientos térmicos constituyen sistemas de conservación habitualmente utilizados en la fabricación de frutas confitadas, y en

general en alimentos y bebidas. Por tanto, la aplicación de elevadas temperaturas podría ser insuficiente para una buena conservación de alimentos con elevado contenido en azúcar.

Las medidas de conservación en la industria alimentaria son esenciales para evitar los problemas de contaminación antes mencionados. Factores como altas temperaturas, conservantes o medidas higiénicas son frecuentemente utilizados en la industria. Los ácidos orgánicos, aunque son constituyentes naturales de los alimentos, se emplean principalmente en alimentos ácidos, para prevenir el crecimiento de levaduras y hongos. Esto se debe a que son más efectivos a pH bajo. Es bien conocida la elevada resistencia de *Z. bailii* al ácido sórbico y benzoico (Steels y col., 1999). Estos conservantes están permitidos en Europa, aunque sólo se añaden a unos niveles específicos dependiendo del tipo de alimento (Anon., 1989). Su uso está muy extendido en alimentos como jarabes de frutas, dulces, productos de panadería, vino y refrescos (Stratford y Eklund, 2003). En este trabajo, se ha demostrado la gran resistencia de todas las cepas de *Z. bailii* a estos ácidos. Además, estas cepas también mostraron elevada tolerancia a otros conservantes analizados, como el ácido acético y ácido cinámico, que habitualmente se utilizan para la conservación de salsas, dulces y bebidas (Anon., 1989). En concreto, las cepas CECT 12001 y CECT 12002 mostraron un nivel de tolerancia similar a todos los conservantes estudiados. Ambas cepas fueron extremadamente resistentes a SO₂, un conservante tradicional de vino y sidra y que también se aplica a frutas frescas y desecadas en niveles bajos, para mantener la calidad organoléptica. Por tanto, no es de extrañar que muchos alimentos conservados con sulfito, presenten alteraciones dominadas por *Z. bailii* (Deak y Beuchat, 1996). Esta característica se observó también en *Z. lentus*, corroborando así los datos obtenidos por otros autores (Stratford, 2005; Thomas, 1993). Esta cepa, además de ser resistente a SO₂, creció en medios con 6,3 mM de ácido sórbico, 3,6 mM de ácido benzoico y 2,25 mM de ácido cinámico, indicando así el potencial de esta especie para crecer en alimentos con conservantes (Steels y col., 1999; 2002). El etanol, además de estar presente en bebidas alcohólicas, también se utiliza en alimentos envasados, como los productos de panadería (Kalathenos y Russell, 2003). Estos productos son susceptibles de alteración por levaduras de las especies *Z. bailii* y *Z. rouxii* (Deak y Beuchat, 1996). En este estudio, se determinó que las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* analizadas, mostraban gran resistencia a etanol en comparación con las especies *Z. lentus*, *P. guilliermondii* y *Candida*. Otro compuesto analizado es el DMDC (Velcorin™), que se utiliza en la industria como esterilizante en refrescos, vino, sidra y cerveza. Los resultados obtenidos en este caso mostraron que *Z. lentus* era más sensible al DMDC

Capítulo 3

que las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* analizadas. Además, *Pichia guilliermondii* y *Candida magnoliae* desarrollaron la misma resistencia a DMDC que las cepas de *Z. bailii*.

Por otra parte, los biocidas como el ácido peracético, hipoclorito sódico y peróxido de hidrógeno se han utilizado extensamente en la industria. Estudios previos han demostrado su efectividad como bactericidas, fungicidas y esporicidas (Baldry, 1983). La acción de los tratamientos de higiene con ácido peracético e hipoclorito sódico ha sido estudiada frente a bacterias, bacteriofagos y biofilms, sugiriendo resistencias bacterianas (Bore y col., 2005; Chantarapanont y col., 2004; Spoering y Lewis, 2001; Stopforth y col., 2002). Sin embargo, existen pocos trabajos sobre la tolerancia de las levaduras a los compuestos desinfectantes (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996, Buschini y col., 2004). Así, Buschini y colaboradores (2004) determinaron que el hipoclorito sódico y el ácido peracético resultaban genotóxicos, con una efectividad similar sobre *S. cerevisiae*. Sin embargo, en nuestro caso se ha determinado una acción diferente de ambos compuestos, observándose en general una mayor sensibilidad de las levaduras al hipoclorito sódico. Además, *Candida halophila* y *C. magnoliae* resultaron ser más resistentes al ácido peracético, mientras que la especie más resistente a peróxido de hidrógeno fue *C. magnoliae*. Estos resultados pueden ser de gran utilidad para poder establecer buenos programas de saneamiento industrial, que contribuya a la ausencia de especies alterantes después de la limpieza y desinfección.

En general, la fisiología de los dos aislados de frutas confitadas pertenecientes a *Z. bailii* (CECT 12001 y CECT 12002) fue muy similar: produjeron más cantidad de gas que el resto de cepas de *Z. bailii*, crecieron inusualmente a 37°C y mostraron una destacada tolerancia a los conservantes. La caracterización de estas cepas mediante técnicas moleculares (análisis de restricción del mtDNA y RAPD con OPA 10 y OPA 15) sugirió que ambas cepas eran idénticas (Martorell y col., 2005b), resultado que se corroboró mediante los ensayos fisiológicos. Las dos cepas de *Z. rouxii*, CECT 12003 y CECT 12004, también aisladas de la empresa de frutas confitadas, mostraron más diferencias en su fisiología y resistencia a conservantes: se pudo observar distinta morfología colonial, mientras que una cepa CECT 12003 (que mostró el patrón A mediante RAPD-PCR), resultó ser muy resistente ácido benzoico y cinámico. Estos resultados de caracterización fisiológica están en concordancia con los obtenidos mediante técnicas moleculares (RFLP de mtDNA y RAPD con OPA 3), y que permitieron determinar dos patrones genéticos, A y B, mostrando que se trata de cepas distintas.

En conclusión, las cepas aisladas de la fábrica de frutas confitadas, identificadas como *Z. bailii* y *Z. rouxii*, desarrollaron un comportamiento fisiológico particular, tal como la resistencia a conservantes de tipo ácido débil, extrema osmotolerancia y capacidad de

adaptación a glucosa y a elevadas temperaturas; así como capacidad para crecer a pH muy bajo y fermentar la glucosa, produciendo elevadas cantidades de gas. Las características fisiológicas de estas cepas no sólo justifican su presencia en alimentos con elevado contenido en azúcar y conservantes, como las frutas confitadas y jarabes, sino su potencial para contaminar y alterar otro tipo de alimentos. El presente estudio muestra la importancia de realizar un estudio conjunto, tanto a nivel molecular como a nivel fisiológico, de las levaduras responsables del suceso de alteración alimentaria. Esto permitirá establecer un balance entre los sistemas de conservación, utilizados para mejorar la calidad del producto y alargar su vida media, y los tratamientos de higiene apropiados en cada caso en la industria.

Capítulo 4: Estudio del origen de contaminación en vinos por levaduras productoras de 4-etilfenol

A lo largo de los capítulos anteriores se ha insistido en el hecho de que el papel de las levaduras en la alteración de alimentos y bebidas está empezando a suscitar un gran interés por parte de las industrias de alimentos. Un buen ejemplo lo constituye la industria vinica donde serios problemas microbiológicos son causados por levaduras, entre otras cosas porque el vino constituye un medio de cultivo muy apropiado para su desarrollo. Su riqueza en ácidos orgánicos, aminoácidos, restos de azúcares, factores de crecimiento y sales minerales contribuyen a ello. Entre los efectos de alteración más importantes destacan la formación de películas en la superficie del vino durante su almacenamiento, la formación de sedimentos y producción de gas en vino embotellado, o malos aromas y sabores durante la producción y embotellado del vino (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

Las levaduras del género *Dekkera* (forma perfecta de *Brettanomyces*) están descritas como las principales alterantes en vinos tintos, ya que pueden producir elevadas cantidades de compuestos fenólicos (4-etilfenol y 4-etilguaiacol) que, si superan un límite (620 µg/L), dan lugar a aromas desagradables en el vino tinto (Chatonnet y col., 1992, 1995, 1997). La especie más representativa del género es *D. bruxellensis* (Mitrakul y col., 1999, Rodrigues y col., 2001b). Recientemente se ha descrito por primera vez que especies pertenecientes a otros géneros de levadura son igualmente productoras de fenoles volátiles (Dias y col., 2003a). Entre ellas, sólo *Pichia guilliermondii* posee cepas con capacidad para producir 4-etilfenol en concentraciones tan elevadas como las observadas en *D. bruxellensis* (Dias y col., 2003a). Sin embargo, ninguna de estas cepas fueron aisladas de vinos por lo que la presencia de *P. guilliermondii* en los mismos como alterante con capacidad de producir olores fenólicos está todavía por demostrar. Con esta idea, en el presente trabajo, se han aislado a partir de distintos orígenes, incluyendo vino, un gran número de cepas en base a su capacidad de liberar olor a fenol en medio diferencial de *Dekkera/Brettanomyces*. Dichos aislados se han identificado molecularmente en busca de cepas pertenecientes a la especie *P. guilliermondii* y se ha estudiado su capacidad para producir eficientemente 4-etilfenol.

Por otro lado, la alteración del vino por levaduras productoras de 4-etilfenol supone un problema grave para las bodegas ya que los olores producidos son tan desagradables (establo, cuero) que el rechazo por parte del consumidor está asegurado. Esto obliga a que una vez detectado el agente causal y sobre todo la alteración, los enólogos se vean en muchas ocasiones obligados a parar el proceso. Por tanto, en el caso de este tipo de alterantes interesa asegurar su ausencia a lo largo de la cadena de producción evitando así riesgos económicos importantes. En este sentido, el conocimiento de la ruta de contaminación sería de gran utilidad pues permitiría a las bodegas adoptar medidas correctoras. Actualmente, no está claro cual es la ruta de entrada en vinos de las

levaduras pertenecientes a las especies *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii*. Por este motivo, hemos considerado así mismo interesante abordar aspectos relacionados con la procedencia de las mismas y explicar así su presencia tanto en la bodega como en el vino.

4.1. Aislamiento e identificación de levaduras productoras de 4-etilfenol.

En colaboración con el grupo del Dr. Virgilio Loureiro, se aislaron levaduras productoras de 4-etilfenol a partir de muestras procedentes de distintas bodegas ubicadas en diversas regiones de Portugal, España y EEUU. En concreto, se tomaron muestras a partir de barricas, prensas y bombas de salida. Además, en el trabajo se han incluido cepas aisladas a partir de uva (frutas y raspones), de vino (tintos y blanco espumoso) e insectos presentes en el ambiente de la bodega (*Drosophila* sp.). Tal y como se describe en el apartado 6 de Materiales y Métodos, se utilizó el medio DBDM, que permite detectar las especies productoras de 4-etilfenol (Dias y col., 2003b; Rodrigues y col., 2001b). Todas las cepas que fueron capaces de crecer en medio DBDM y producir olor fenólico se seleccionaron, y se confirmó su capacidad para producir 4-etilfenol mediante cromatografía de gases.

Cada uno de estos aislados se identificó mediante análisis de restricción de la región 5,8S-ITS. Como resultado, un total de 63 cepas, presentaban un tamaño de amplificado de 485 pb y un patrón de restricción de 255+140+90 (*CfoI*), 375+95 (*HaeIII*) y 270+215 (*HinfI*), fueron identificadas como *Dekkera bruxellensis*. Además, 32 cepas fueron identificadas como *Pichia guilliermondii*, con un tamaño de amplificado de 625 pb y patrones de restricción de 300+260+65 (*CfoI*), 400+115+90 (*HaeIII*) y 320+300 (*HinfI*). Dicha identificación se confirmó mediante secuenciación de los dominios D1/D2 del gen 26S rDNA en 3 cepas representativas de cada patrón, obteniéndose un 99% de homología con las secuencias de las bases de datos pertenecientes a *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii* (Blastn).

4.2. Caracterización molecular de aislados de *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii*.

La caracterización a nivel de cepa de los aislados productores de 4-etilfenol identificados en el apartado anterior, era necesaria para poder estudiar el origen de contaminación por estas levaduras en vino, así como las rutas de contaminación y los puntos críticos a lo largo de la bodega. Para tal fin, es necesaria la utilización de técnicas

con gran capacidad para diferenciar a nivel de cepa. En este caso, se ha utilizado la técnica de análisis de restricción del mtDNA y la técnica de RAPD-PCR.

4.2.1. *Dekkera bruxellensis*.

Los aislados identificados como *D. bruxellensis* fueron caracterizados mediante el análisis de restricción del mtDNA utilizando el enzima de restricción *Hinfl*. De esta manera, se determinaron 3 patrones moleculares diferentes que se denominaron A, B y C (Figura 12a). El patrón A fue el más común (Tabla 25) y estaba presente en un total de 58 cepas de las 63 analizadas. Estos aislados se obtuvieron de diferentes países (Portugal, España y EEUU) y dentro de Portugal, se aisló de diferentes áreas geográficas (Alentejo, Dão, Estremadura y Ribatejo). Además, se encontraron en distintos tipos de muestras, en concreto, madera de barrica, vino (tinto, blanco y espumoso) y en insectos. El patrón B fue compartido por 4 aislados, 3 de ellos obtenidos en las regiones de Ribatejo y Alentejo (Portugal) a partir de diferentes vinos, y uno cedido por la Escuela Superior de Biotecnología (Portugal). Finalmente, sólo un aislado procedente de vino de la región portuguesa de Dão mostró el patrón C (Tabla 25).

De estos datos se deduce que los aislados de *D. bruxellensis* muestran una baja variabilidad. Para conseguir un mayor nivel de discriminación, las 58 cepas que compartieron el patrón mayoritario (A) se sometieron a un nuevo análisis molecular utilizando la técnica de RAPD-PCR ya que trabajos previos habían mostrado la capacidad de esta técnica para discriminar cepas de colección pertenecientes a esta especie (Mitrakul y col., 1999). Esta técnica proporcionó un mayor nivel de discriminación que el análisis de restricción del mtDNA. Se obtuvieron 5 patrones diferentes con los oligonucleótidos OPA 2 y OPA 3, y 6 patrones con el oligonucleótido OPA 9 (Figura 13). Sin embargo, la máxima resolución se observó tras combinar los resultados proporcionados por cada uno de los tres oligonucleótidos obteniéndose 12 haplotipos o patrones compuestos. De ellos, el patrón compuesto nº 2 fue el más común, presente en 16 aislados de diferentes regiones de Portugal y EEUU, y distintos orígenes como vino, madera de barrica e insectos. Doce cepas aisladas de vinos españoles y portugueses, y de madera de barrica, mostraron el patrón compuesto nº 4. Los patrones nº 6 y nº 11 también fueron frecuentes, determinados en 9 y 7 cepas respectivamente, pero limitados a las bodegas 6 y 11 de Alentejo (Portugal). Los otros patrones no fueron tan frecuentes y algunos de ellos sólo estaban representados por uno o dos aislados.

La discriminación a nivel de cepa mediante RAPD-PCR, resultó además de gran utilidad para establecer diferencias entre aislados de *D. bruxellensis* procedentes de una

Capítulo 4

misma bodega, y así estudiar su trazabilidad. En el caso de la bodega 6, y debido a la gran diversidad de fuentes de aislamiento, se pudo detectar el patrón compuesto nº 2 (el más común) en vino joven o embotellado, insecto y madera de bodega, y el patrón compuesto nº 6 en insectos y madera de bodega (Tabla 25). En concreto, las cepas aisladas de madera de bodega mostraron 5 patrones diferentes (2, 4, 6, 11, 12). Esta observación indicaría que los insectos facilitan la propagación de las levaduras de la especie *D. bruxellensis* dentro de la bodega, que están presentes en los vinos antes de su envejecimiento en la bodega. La presencia de los haplotipos 4 y 12 tanto en cepas aisladas de madera de bodega (bodega 6), como en aislados de vinos obtenidos de diferentes bodegas, corrobora la hipótesis anterior, que sugiere que el origen de contaminación no procede de la madera de las bodegas.

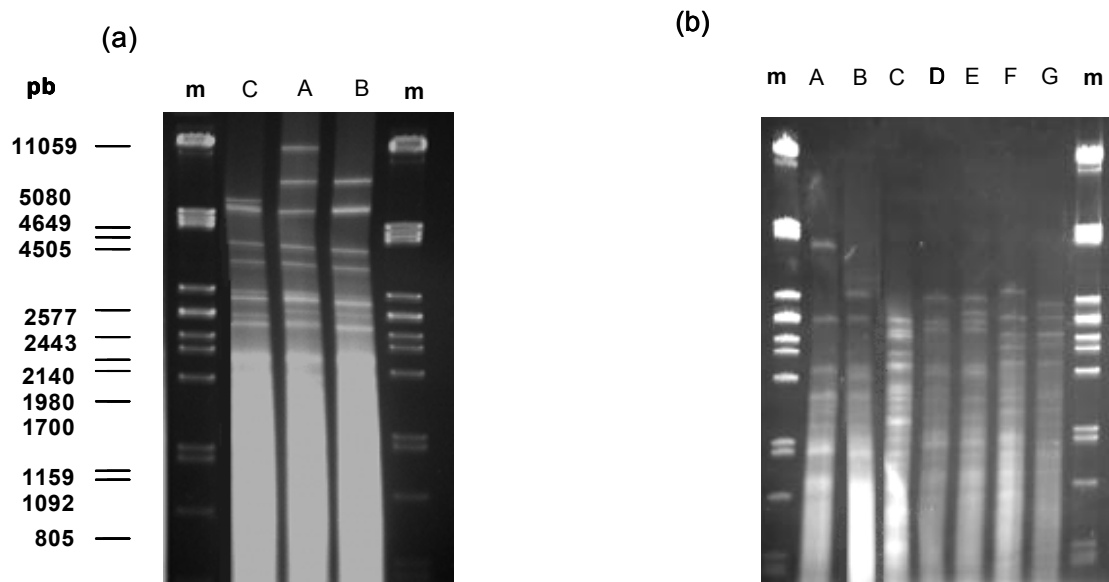


Figura 12. Patrones de restricción de mtDNA obtenidos con *Hin*I en cepas de (a) *D. bruxellensis* y (b) *P. guilliermondii*, descritas en la Tabla 25 y 26. Marcador molecular: DNA λ digerido con *Pst*I.

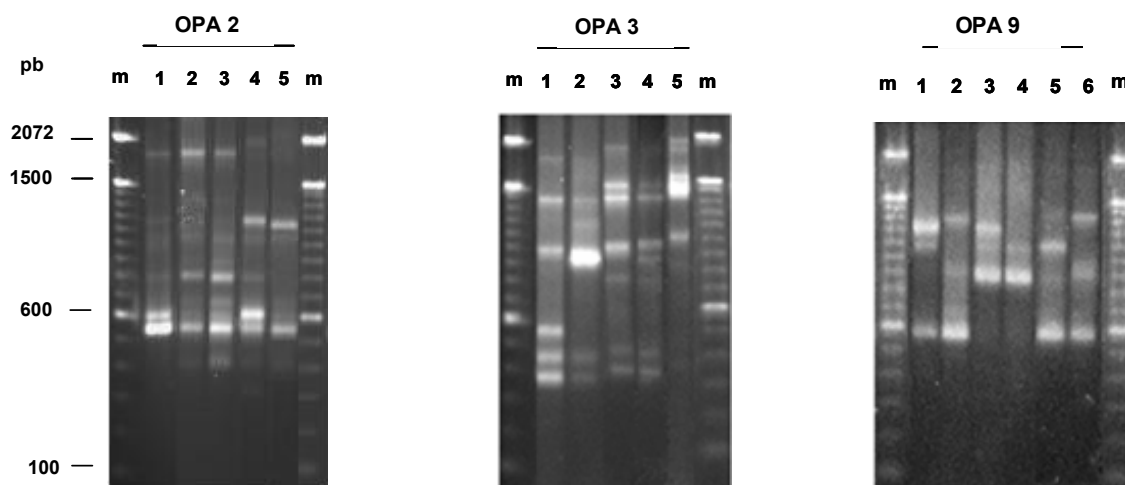


Figura 13. Patrones de RAPD obtenidos con los OPA 2, 3 y 9 en las cepas de *D. bruxellensis* que compartían el patrón A resultante de la restricción del mtDNA (*Hinfl*), y que se detallan en la Tabla 25. El marcador de 100 pb se utilizó como estándar de tamaños moleculares.

4.2.2. *Pichia guilliermondii*.

Se caracterizaron un total de 32 aislados procedentes de diferentes bodegas de la región de Alentejo (Portugal), identificados previamente como *P. guilliermondii*. Para ello, se utilizó el análisis de restricción del mtDNA con la endonucleasa *Hinfl*. En este caso, se obtuvo una gran variabilidad en el mtDNA, siendo posible determinar 7 patrones de restricción diferentes (A-G en Figura 12b). Este alto grado de variabilidad también se observó en aislados procedentes de una misma bodega (Tabla 26). Este es el caso de la bodega 6 donde se identificaron 5 patrones diferentes entre las cepas aisladas de barrica (A, B, C, D y G) y 3 patrones (E, F y G) entre las cepas aisladas de uva. Así mismo se encontraron 2 patrones en la bodega 5 (F y B) y 10 (F y G). Los patrones A, F, y G fueron los más comunes, distribuidos en 4 de las bodegas incluidas en este estudio.

Capítulo 4

Tabla 25. Patrones de restricción de mtDNA y haplotipos de RAPD obtenidos en las 63 cepas de *D. bruxellensis* analizadas en este estudio.

Cepa	DNAm ^t /Hinfl	Patrón RAPD			Haplotipo (RAPDs)	Origen
		OPA 2	OPA 3	OPA 9		
1327	A	1	1	1	1	Vino blanco espumoso (Ribatejo, Portugal),
1328	A	1	1	1	1	"
1601	A	1	1	1	1	"
1792	A	2	1	2	2	Vino tinto (ESB, Portugal)
2128	A	2	1	2	2	Vino tinto de diferentes bodegas (Dão, Portugal)
2129	A	2	1	2	2	"
2130	A	2	1	2	2	"
2102	A	2	1	2	2	Vino tinto, bodega 6 (Alentejo, Portugal)
2114	A	2	1	2	2	Vinos tintos de diferentes bodegas (Ribatejo, Portugal)
2117	A	2	1	2	2	"
2118	A	2	1	2	2	"
544	A	2	1	2	2	Madera de bodega, bodega 6 (Alentejo, Portugal)
545	A	2	1	2	2	"
546	A	2	1	2	2	"
548	A	2	1	2	2	"
NP26	A	2	1	2	2	<i>Drosophila</i> , bodega 6 (Alentejo, Portugal)
NP27	A	2	1	2	2	"
2173	A	2	1	2	2	Vino tinto embotellado (California, EEUU)
2174	A	2	1	2	2	"
1700	A	2	2	3	3	Vino tinto de diferentes bodegas (Dão, Portugal)
1704	A	2	2	3	3	"
1701	A	2	2	4	4	Vino tinto de diferentes bodegas (Dão, Portugal)
1702	A	2	2	4	4	"
1703	A	2	2	4	4	"
2127	A	2	2	4	4	"
531	A	2	2	4	4	Madera de bodega, bodega 6 (Alentejo, Portugal)
532	A	2	2	4	4	"
533	A	2	2	4	4	"
534	A	2	2	4	4	"
536	A	2	2	4	4	"
537	A	2	2	4	4	"
2287	A	2	2	4	4	Vino tinto (Utiel-Requena, España)
2288	A	2	2	4	4	"
1717	A	3	2	5	5	Vino blanco (Estremadura, Portugal)

Continuación Tabla 25.

Cepa	DNAm/ Hinfl	Patrón RAPD			Haplotipo (RAPDs)	Origen
		OPA 2	OPA 3	OPA 9		
2113	A	2	1	6	6	Vino tinto embotellado, bodega 11 (Alentejo, Portugal)
538	A	2	1	6	6	Madera de barrica, bodega 6 (Alentejo, Portugal)
539	A	2	1	6	6	"
540	A	2	1	6	6	"
541	A	2	1	6	6	"
542	A	2	1	6	6	"
543	A	2	1	6	6	"
NP22	A	2	1	6	6	<i>Drosophila</i> , bodega 6 (Alentejo, Portugal)
NP24	A	2	1	6	6	"
2132	A	4	3	4	7	Vino tinto barril, bodega 11 (Alentejo, Portugal)
2133	A	4	3	4	7	"
2101	A	1	1	4	8	Vino tinto, bodega 6 (Alentejo, Portugal)
2115	A	4	1	4	9	Vino tinto de diferentes bodegas (Ribatejo, Portugal)
2120	A	4	4	4	10	"
400	A	5	5	4	11	Madera de barrica, bodega 6 (Alentejo, Portugal)
401	A	5	5	4	11	"
402	A	5	5	4	11	"
405	A	5	5	4	11	"
411	A	5	5	4	11	"
416	A	5	5	4	11	"
418	A	5	5	4	11	"
419	A	5	1	4	12	"
423	A	5	1	4	12	"
2172	A	5	1	4	12	Vino tinto (España)
1600	B	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Vino blanco espumoso (Ribatejo, Portugal)
1794	B	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Vino tinto (ESB, Portugal)
2104	B	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Vino tinto, bodega 3 (Alentejo, Portugal)
2121	B	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Vino tinto de diferentes bodegas (Ribatejo, Portugal)
1791	C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Vino tinto de diferentes bodegas (Dão, Portugal)

N.D.: No determinado

4.3. Producción de 4-etilfenol por cepas de *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii*.

La producción de 4-etilfenol por las cepas de *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii* aisladas, fue analizada cuantitativamente mediante cromatografía de gases. Todas las cepas de *D. bruxellensis* produjeron altos niveles de 4-etilfenol (más de 50 mg/L). Sin embargo, se obtuvieron diferentes niveles de este compuesto para las distintas cepas de *P. guilliermondii* incluidas en el estudio (Tabla 26). De esta forma, se diferenciaron 2 grupos de cepas en función del nivel de producción de 4-etilfenol. Un grupo, que incluía cepas aisladas de distintos orígenes como madera de barrica, uvas, prensa rodillo, insectos, bomba de salida y vino, producían entre 0,1 y 1 mg/L de 4-etilfenol. Un segundo grupo de cepas mostró la capacidad de producir elevadas cantidades de este compuesto, entre 51 y 68,9 mg/L. Estas cepas se aislaron de madera de barrica, vino, uvas, raspones e insectos, en diferentes bodegas. Además, fue posible determinar una relación entre los patrones de restricción del mtDNA y el grado de producción de 4-etilfenol en cepas de *P. guilliermondii*. Así, las cepas altamente productoras de 4-etilfenol mostraron los patrones de mtDNA F y G, mientras que las cepas con los patrones A, B, C y D producían poca cantidad de este compuesto. Las cepas altamente productoras de 4-etilfenol, y por tanto, potencialmente alterantes, fueron aisladas de distintos orígenes en 3 bodegas. En la bodega 6, el patrón F se determinó en 4 cepas aisladas de uva y raspones y en una cepa aislada de vino. En la bodega 5, el patrón F se observó en dos cepas aisladas de uva, una cepa de *Drosophila*, y una cepa aislada de la prensa rodillo durante la vendimia. En las bodegas 6 y 10, se determinó la presencia de 4 cepas con el patrón G, aisladas de uvas y raspones. Este patrón también fue obtenido en una cepa aislada de *Drosophila* en la bodega 10. Estos resultados indicarían de nuevo que la contaminación de los vinos en la bodega por cepas de *P. guilliermondii* procede del exterior, a través de los racimos de uva o los insectos que se encuentran en el hábitat de producción del vino.

Tabla 26. Producción de 4-etilfenol (4-EF) y patrones obtenidos mediante restricción de mtDNA en las cepas de *Pichia guilliermondii* analizadas en este estudio.

Cepa	4-EF (mg/L) ^{a,b}	DNAmt/Hinfl	Origen
407	0,9	A	Madera de barrica, bodega 6
408	0,9	B	Madera de barrica, bodega 6
409	0,7	A	Madera de barrica, bodega 6
410	0,6	C	Madera de barrica, bodega 6
412	0,3	A	Madera de barrica, bodega 6
413	0,6	D	Madera de barrica, bodega 6
414	1,0	A	Madera de barrica, bodega 6
421	0,7	B	Madera de barrica, bodega 6
422	0,1	B	Madera de barrica, bodega 6
420	0,7	A	Madera de barrica, bodega 6
430b	51,0	G	Madera de barrica, bodega 6
2105	61,5	F	Uvas, bodega 5
2106	0,5	E	Uvas, bodega 6
2107	0,5	A	<i>Drosophila</i> , bodega 1
2108	0,4	A	<i>Drosophila</i> , bodega 1
2109	0,4	A	<i>Drosophila</i> , bodega 1
2110	0,5	A	Vino tinto, bodega 4
2119	0,3	E	Uvas, bodega 6
2122	52,4	F	Uvas, bodega 5
2125	0,4	B	Bomba de salida, bodega 5
2126	53,2	F	Prensa rodillo, bodega 5
2131	63,9	F	Vino, bodega 6
2134	65,3	F	Uvas, bodega 6
2135	60,3	G	Uvas, bodega 6
2136	64,4	F	Uvas, bodega 6
2137	68,7	G	Raspones, bodega 6
2138	61,7	F	Raspones, bodega 6
2139	57,5	F	Raspones, bodega 6
2141	55,4	G	<i>Drosophila</i> , bodega 10
2142	68,9	F	Uvas, bodega 10
2143	65,3	F	<i>Drosophila</i> , bodega 5
2145	56,4	G	Raspones, bodega 10

Producción máxima de 4-etilfenol (mg/L) en medio sintético con adición de 100 g/L de ácido *p*-cumárico; ^b Los datos de las cepas 2105 a 2110, y 2122 a 2126 fueron obtenidos por Días y colaboradores (2003a).

4.4. Discusión.

En el presente estudio se muestra como las especies *Dekkera bruxellensis* y *Pichia guilliermondii* están ampliamente distribuidas en la bodega, por lo que pueden ser contaminantes importantes del vino. *Dekkera bruxellensis* es una de las especies más peligrosas para el vino, no sólo por ser responsables de elevados niveles de fenoles volátiles en éste, sino porque pueden contribuir a la producción de aminas biogénicas por parte de las bacterias lácticas como consecuencia de su auto lisis (Leitao y col., 2000). Sin embargo, su presencia puede pasar inadvertida en determinadas etapas de producción del vino, como la fermentación, debido al crecimiento lento que presentan con respecto a otras levaduras y hongos y al uso de métodos de aislamiento inadecuados.

El estudio molecular del conjunto de aislados procedentes de vino y otras fuentes de la bodega, permitió determinar un elevado grado de polimorfismo genético tanto en *D. bruxellensis* como en *P. guilliermondii* (Martorell y col., 2005c). Las técnicas aplicadas, análisis de restricción del mtDNA y RAPD-PCR, fueron muy útiles para tipificar las cepas de ambas especies. En el caso de *D. bruxellensis*, se obtuvo baja variabilidad en el mtDNA con el enzima *Hinfl*, consiguiendo mayor diferenciación intraespecífica con RAPD-PCR. Fue posible observar la presencia de cepas con el mismo haplotipo en madera de bodega, vino y *Drosophila* presente en el ambiente de la bodega. Existen pocos estudios que describen el aislamiento de cepas de *D. bruxellensis* a partir de los equipos de la bodega. Estudios previos muestran la presencia de esta especie en uvas, tanques, barriles y zonas de embotellado (Algualcíl y col., 1998; Connel y col., 2002). Nuestros resultados indican que la contaminación del vino tiene lugar antes de su depósito en la bodega y que los insectos actúan como vectores de las levaduras. La filtración del vino antes del proceso de envejecimiento en bodega podría evitar los problemas de contaminación. Sin embargo, de acuerdo con datos previos, las bodegas de madera se consideran un nicho ecológico para el crecimiento de *D. bruxellensis* (Chatonnet y col., 1992). Además, la utilización de SO₂, agua caliente o la vaporización son insuficientes para el saneamiento de las bodegas y la total eliminación de estas levaduras (Laureano y col., 2003). Por tanto, sería necesario llevar a cabo un control microbiológico más estricto durante la elaboración del vino, mediante la aplicación de conservantes como SO₂ o DMDC.

Además de la existencia de variabilidad intraespecífica en los aislados de *D. bruxellensis*, cabe destacar la amplia distribución de algunos haplotipos (2, 4 y 12), que fueron encontrados en cepas de diferentes regiones de Portugal, España y EEUU. Análisis adicionales de un número mayor de muestras nos permitirían determinar si la

observada predominancia del patrón 2 se cumple también en muestras procedentes de otros países. Mitrakul y colaboradores (1999), determinaron un menor grado de polimorfismo (sólo dos patrones), que puede ser debido a la utilización de un número pequeño de muestras. De manera similar, de Barros-Lopes y colaboradores (1999) únicamente determinaron polimorfismo en 7 cepas de *D. bruxellensis* mediante AFLP. Aún así, cabe destacar que, en comparación con otros géneros como *Saccharomyces*, el polimorfismo descrito en este trabajo para *D. bruxellensis* es más bajo.

En cuanto a *P. guilliermondii*, la restricción del mtDNA con *HinfI* proporcionó una alta variabilidad en las cepas analizadas. Se observaron 7 patrones diferentes, presentes en cepas de diferentes orígenes sólo en bodegas de Alentejo (Portugal). Los patrones F y G fueron los más relevantes, ya que se encontraron en cepas altamente productoras de 4-etilfenol. Dichas cepas fueron aisladas de uvas, raspones, madera de barrica, vino y *Drosophila*, mostrando que las uvas y raspones podrían ser el origen de contaminación. Como se ha mostrado, todas las cepas de *D. bruxellensis* producían altas cantidades de 4-EF, por lo que no pudimos confirmar la existencia de cepas no productoras como describe Fugelsang (1997). La especie *D. anomala* es también un conocido contaminante de cerveza y también productor de 4-EF (Dias y col., 2003b), pero nunca se ha podido aislar de vinos. De hecho, Mitrakul y colaboradores (1999) aislaron algunas cepas de *D. anomala* de vino, y tras la identificación mediante técnicas clásicas, resultaron ser *D. bruxellensis*. En nuestro estudio tampoco hemos aislado cepas de *D. anomala*, por tanto *D. bruxellensis* aparece como la única especie representativa del género en vinos (Egli y Henick-Kling, 2001; Mitrakul y col., 1999; Stender y col., 2001).

En un trabajo previo, Días y colaboradores (2003a) mostraron la capacidad de *P. guilliermondii* para producir 4-EF. Nuestros resultados confirman estas observaciones y por primera vez se han identificado cepas de *P. guilliermondii* aisladas de vinos y que son altamente productoras de 4-EF, a niveles comparables con los producidos por *D. bruxellensis*. Además, se ha encontrado una relación entre los patrones de restricción del mtDNA y la producción de 4-etilfenol. Sólo las cepas con patrón F o G resultaron ser altamente productoras de este compuesto, por lo que estos patrones podrían utilizarse como marcadores moleculares de este comportamiento fisiológico en *P. guilliermondii*. Además, para poder valorar el riesgo de alteración asociado a estas especies, la producción potencial de 4-etilfenol debería investigarse bajo condiciones reales de producción de vino.

Como conclusión, los resultados obtenidos muestran que *D. bruxellensis* y *P. guilliermondii* se pueden considerar especies alterantes importantes en la industria vínica, con capacidad para producir grandes niveles de 4-EF y, por tanto, producir aromas

indeseables en el vino. Además, la aplicación de técnicas de tipificación que permitan la diferenciación intraespecífica resulta necesaria para establecer las rutas de diseminación de las levaduras en el ambiente de producción del vino. Hemos podido determinar que, en el caso de *D. bruxellensis*, la contaminación no procede de la bodega, sino que estas levaduras están presentes en vino joven antes de su envejecimiento en las mismas. De igual manera, la contaminación en bodega por levaduras de la especie *P. guilliermondii* se produce en etapas tempranas de elaboración del vino, siendo su origen los racimos de uva. Se ha demostrado además, que los insectos presentes en el ambiente actúan como dispersores de ambas especies en las distintas instalaciones de la bodega. El esclarecimiento de las rutas de contaminación es de gran ayuda para las bodegas ya que les permite plantear medidas preventivas tales como el control de insectos en el ambiente de la bodega o la filtración del vino antes de su envejecimiento. Además, este trabajo constituye una vez más un ejemplo claro de como las técnicas moleculares son esenciales para la monitorización de levaduras alterantes, siendo por tanto de gran utilidad su transferencia a los laboratorios industriales.

Capítulo 5: Identificación rápida y cuantificación de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* directamente de vino mediante PCR a tiempo real

En el capítulo anterior tratamos aspectos relacionados con la alteración del vino, en concreto el estudio de las rutas de contaminación por levaduras productoras de 4-etilfenol. Esta es sin duda la alteración por levaduras con consecuencias más graves para los enólogos debido a la producción de olores altamente desagrables. Sin embargo, existen otras especies de levaduras capaces de producir alteraciones con otro tipo de efectos, como son la producción de gas, sedimentos y velos, que no se pueden menospreciar. Entre estas levaduras se encuentra la especie *S. cerevisiae* cuyo papel beneficioso en la producción de vino es bien conocido por ser la levadura predominante durante la fase de fermentación. Sin embargo, tras la fermentación, *S. cerevisiae* puede producir alteración en el vino, bien por una ineficiente eliminación durante la filtración del vino o por una contaminación debido a la presencia de levaduras en la línea de embotellado o en el tapón de corcho (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). *S. cerevisiae* se describe como una importante levadura alterante, ya que presenta una elevada tolerancia al etanol. Fundamentalmente ha sido aislada de vinos dulces, donde pueden volver a fermentar los azúcares residuales, aunque también se encuentra en botellas de vino semi-seco.

Por tanto, para permitir a las bodegas realizar intervenciones inmediatas y efectivas, la detección de las levaduras alterantes debe realizarse de forma rápida. Del conjunto de técnicas descritas en la introducción, los métodos basados en PCR resultan la mejor alternativa. En el caso de *S. cerevisiae*, se han descrito hasta el momento diversos métodos para su detección. Así, el análisis de restricción de amplificadores de la región ribosómica 5,8S-ITS, utilizando las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* o *HinfI*, permite la identificación precisa de esta especie. Los perfiles de restricción para esta especie se pueden encontrar en la bibliografía (Esteve-Zaroso y col., 1999; Fernández-Espinar y col., 2000) así como en una base de datos disponible en Internet en la dirección <http://yeast-id.com/>. Masneuf y colaboradores (1996) desarrollaron un sistema basado en la amplificación por PCR del gen nuclear MET2 y posterior análisis de restricción. Estos autores mostraron que los enzimas *EcoRI*, *MaeIII*, *PstI*, y *NcoI* podían utilizarse para la identificación precisa de *S. cerevisiae*. Otra técnica que actualmente tiene una buena aceptación para la detección de especies de levadura se basa en la obtención de secuencias de los dominios D1/D2 del gen ribosómico 26S, y su comparación con secuencias disponibles en las bases de datos (Arias y col., 2002; Jespersen y col., 2005; van der Aa Kuhle y col., 2001).

Sin embargo, aunque estas técnicas son rápidas, requieren pasos posteriores de análisis como la restricción del DNA o las electroforesis en gel de agarosa, que retardan la obtención de los resultados. Además, tampoco resultan útiles para la obtención del

número de células, un factor importante a tener en cuenta en el control de alteración por levaduras. Como se comenta en el punto 1.4 de la Introducción, en el caso del vino, no se conoce el número exacto de levaduras aceptables ni el potencial de la especie *S. cerevisiae* como alterante. Algunos estudios centrados en *Z. bailii*, consideran que unas pocas células viables pueden ser la causa de alteración en vino embotellado (Deak y Beuchat, 1996). Esto implica que los métodos utilizados para la detección de este tipo de levaduras deben ser muy sensibles, ya que inicialmente pueden estar presentes en bajo número. La detección y cuantificación de células en las bodegas se realiza rutinariamente mediante filtración en membrana e incubación del filtro, o bien mediante la técnica de NMP. Sin embargo ambas técnicas resultan largas, ya que son tediosas y requieren largos tiempos de incubación.

La técnica de electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (DGGE) y la detección a tiempo real han supuesto un avance significativo de los métodos basados en PCR. Ambos permiten realizar una cuantificación de forma simultánea a la detección específica. Además son rápidas y sensibles, por lo que son técnicas muy adecuadas para su uso en los programas de conservación. La técnica de DGGE está siendo muy popular en microbiología de alimentos, y ha sido aplicada para la identificación de *S. cerevisiae* en vino (Cocolin y col., 2000; Manzano y col., 2005). Sin embargo, resulta menos sensible y rápida que las técnicas a tiempo real, por lo que son menos útiles en los programas de prevención de alteración de alimentos. Se han desarrollado numerosos sistemas de PCR a tiempo real para la detección y enumeración de bacterias, especialmente patógenas, extendiéndose posteriormente a levaduras de interés clínico (Bialek y col., 2002; Bu y col., 2005; Pryce y col., 2003; Selvarangan y col., 2003; Trama y col., 2005; White y col., 2003). En el ámbito de los alimentos, esta técnica ha sido aplicada recientemente para la detección de algunas levaduras (Bleve y col., 2003; Casey y Dobson, 2004). Hasta el momento, sólo ha sido utilizada en el caso del vino para la detección de la especie alterante *D. bruxellensis* (Delaherche y col., 2004; Phister y Mills, 2003).

En el presente trabajo, se ha desarrollado un protocolo de PCR a tiempo real para la detección directa y enumeración de levaduras de la especie *S. cerevisiae* en muestras de vino. Para ello se ha utilizado como estrategia de detección y cuantificación el colorante fluorescente no específico SYBR-Green.

5.1. Diseño de oligonucleótidos y especificidad de PCR.

S. cerevisiae está estrechamente relacionada con las especies *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* y *S. kudriavzevii*. Estas seis especies, junto con *S. cerevisiae*, constituyen el complejo *Saccharomyces sensu stricto*. De todas ellas, sólo *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* y recientemente *S. paradoxus* (Redzepovic y col., 2002) están asociadas a procesos fermentativos. Sin embargo, *S. pastorianus* sólo está presente en la elaboración de cerveza y *S. paradoxus* sólo se ha aislado una vez de vino (Redzepovic y col., 2002). A pesar que *S. cerevisiae* y *S. bayanus* son las especies más comunes en la fermentación vínica, en un trabajo previo se mostró cómo, debido a una clasificación incorrecta, todas las cepas comerciales de *S. bayanus* caracterizadas (12 cepas), eran en realidad *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar y col., 2001). Por ello, consideramos interesante abordar el diseño de los oligonucleótidos para la identificación específica de cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*. La proximidad filogenética que presentan estas especies hace que su diferenciación resulte dificultosa.

En un trabajo previo, se mostró que estas cuatro especies podían diferenciarse mediante análisis de RAPD-PCR (Fernández-Espinar y col., 2003), por lo que se aprovechó este hecho. En dicho trabajo, la amplificación con el oligonucleótido decámero OPA 7 (GAAACGGGTG) generó una banda específica de 1800 pb para la especie *S. cerevisiae*. Esta banda estaba presente en las 10 cepas de *S. cerevisiae* analizadas, mientras que no se amplificaba en las otras 3 especies (Figura 14). Esta banda se clonó y se secuenció utilizando el DNA de una de estas cepas (CECT 1485). Mediante el programa informático Primer Express y la secuencia obtenida, se seleccionaron dos oligonucleótidos llamados SC1d (directo), el cual conservó los últimos 8 nucleótidos del OPA 7 en su extremo 3' (5' ACATATGAAGTATGTTTCTATATAAACGGGTG 3'), y SC1r (reverso) localizado dentro de la banda de RAPD secuenciada. Estos oligonucleótidos generaban un producto de PCR con un tamaño apropiado para PCR cuantitativa (301 pb). La especificidad de ambos oligonucleótidos se realizó por comparación de sus secuencias con aquellas disponibles en las bases de datos (Blastn). El oligonucleótido SC1d mostró una homología significativa con *S. cerevisiae*, mientras que en el caso de SC1r se identificaron otras entradas, pero nunca de levaduras o bacterias aisladas de vino.

Capítulo 5

Para evaluar la efectividad y especificidad de los oligonucleótidos diseñados, se realizó una PCR convencional con DNA purificado de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Tabla 27). También se analizaron 9 cepas pertenecientes a especies asociadas a alteraciones en vinos y refrescos (*C. rugosa*, *C. vini*, *C. zeylanoides*, *D. bruxellensis*, *I. orientalis*, *P. membranefaciens*, *S. ludwigii*, *S. pombe* y *Z. bailii*). Se obtuvo un fragmento de DNA de tamaño esperado (301 pb) únicamente en el caso de las cepas de *S. cerevisiae*. La concentración final de oligonucleótidos elegida para los experimentos fue 60 mM, ya que proporcionó el menor valor de C_T y la mejor especificidad.

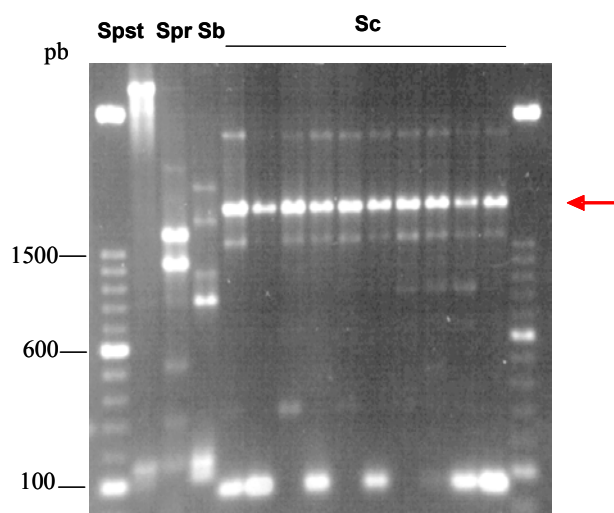


Figura 14. Patrones de RAPD obtenidos con el oligonucleótido de secuencia aleatoria OPA 7. Sb: *S. bayanus* 1941^T; Sc: *S. cerevisiae* 1942^{NT}; Spr: *S. paradoxus* 1939^{NT}; Spst: *S. pastorianus* 1940^{NT} Spst: *S. pastorianus* (1940^{NT}), Spr: *S. paradoxus* (1939^{NT}), Sb: *S. bayanus* (1941^T), SC: *S. cerevisiae* (1475, 1477, 1483, 10393, 1485, 1881, 1883, 1894, 1895). (1) La flecha indica el fragmento de RAPD de 1800 pb específico de la especie *S. cerevisiae*. El marcador de 100 pb (Gibco BRL, Gaithersburg, MD.) se utilizó como estándar de tamaños moleculares.

Tabla 27. Cepas analizadas en el presente trabajo y resultados de amplificación por PCR a tiempo real con los oligonucleótidos SC1d y SC1r.

Especies	Cepas de referencia	PCR convencional ^b	PCR tiempo real ^c
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CECT (1640, 1941 ^T , 1969, 1693, 10174) IFI (369, 371)	–	–
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT (1462, 1475, 1477, 1483, 1485, 1881, 1882, 1883, 1894, 1895, 1942 ^{NT} , 1985, 10120, 10131, 10322, 10393, 10557, 10995), CR ^a , PV ^a	+	+
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CECT (1939 ^{NT} , 10175, 10176, 10308, 11143, 11152, 11158, 11422)	–	–
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CECT (1940 ^{NT} , 1970, 11037, 11185)	–	–
<i>Candida rugosa</i>	CECT 11889 ^T	–	–
<i>Candida vini</i>	CECT 11905 ^T	–	–
<i>Candida zeylanoides</i>	CECT 11907 ^T	–	–
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC 4801	–	–
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CECT 10027	–	–
<i>Pichia membranefaciens</i>	CECT 1115 ^T	–	–
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	CECT 10450 ^T	–	–
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT 11197	–	–
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CECT 11043	–	–

Colecciones de cultivo: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España; IFI, Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid, España; IGC, Colección de levaduras de Oeiras, Portugal; ^a cepas de panadería comerciales de *S. cerevisiae*; ^b –/+, ausencia/presencia de producto de PCR (301 pb); ^c –/+, ausencia/presencia de curva de disociación (T_m , 78,5°C).

5.2. PCR a tiempo real en cultivos puros.

5.2.1. Detección.

Se sometieron a amplificación por PCR a tiempo real 10 ng/ μ L de DNA de la cepa de *S. cerevisiae* CECT 1485 utilizando el agente intercalante de DNA SYBR-Green. La curva de disociación obtenida para el amplificado generado mostró un valor de temperatura de hibridación (T_m) de 78,5 °C (Figura 15). La especificidad del sistema se valoró utilizando las mismas especies que en PCR convencional. De nuevo, la amplificación representada por la curva de disociación con la T_m esperada se detectó sólo en las cepas que pertenecían a la especie *S. cerevisiae* (Tabla 27), lo que evidenció la especificidad del sistema desarrollado. No se observaron productos inespecíficos o dímeros de primer con T_{ms} . menores.

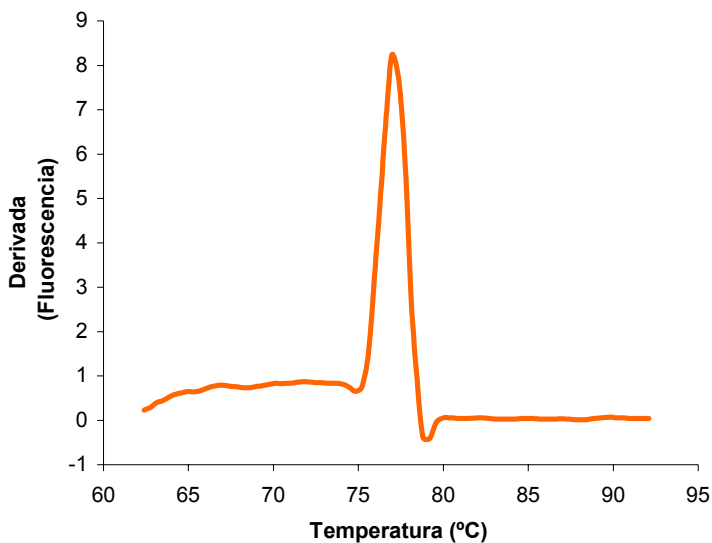


Figura 15. Análisis de la curva de disociación del producto de amplificado de *S. cerevisiae*.

5.2.2. Sensibilidad.

Para determinar el número mínimo de células por mililitro que el método desarrollado era capaz de detectar, se obtuvo DNA a partir de un cultivo de *S. cerevisiae* que contenía una concentración de $5,6 \times 10^7$ UFC/mL, y se realizaron diluciones seriadas que se sometieron a amplificación por PCR a tiempo real. Los resultados se representaron como número de ciclos respecto a intensidad de fluorescencia (Figura 16).

Se obtuvieron curvas de amplificación para concentraciones de células entre $5,6 \times 10^6$ UFC/mL a 5,6 UFC/mL.

Aunque el método resultó muy sensible (5,6 UFC/mL), resulta interesante poder detectar concentraciones menores a 1 UFC/mL, ya que una sola célula puede crecer durante el almacenamiento y por tanto causar alteración. Para incrementar la sensibilidad del método, se realizaron ensayos de enriquecimiento como se describe en el apartado 4.3 de Materiales y Métodos. Así, muestras de GPY que contenían entre 0,03 y 0,8 UFC/mL de *S. cerevisiae* se analizaron por PCR a tiempo real tras un paso de enriquecimiento. Se pudo observar que, tras 8 horas de enriquecimiento, se detectaban levaduras en las muestras que contenían 0,8 UFC/mL, mientras que el resto de muestras (que contenían entre 0,03 y 0,4 UFC/mL de *S. cerevisiae*) la detección tuvo lugar después de 12h. Estos resultados indicaron que la PCR a tiempo real desarrollada fue suficientemente sensible para detectar alrededor de 5 UFC/mL directamente en la muestra, y entre 0,03 y 0,8 UFC/mL de *S. cerevisiae*, equivalente a 3 UFC/mL en 100 mL, cuando se combina con un paso de enriquecimiento en YPD.

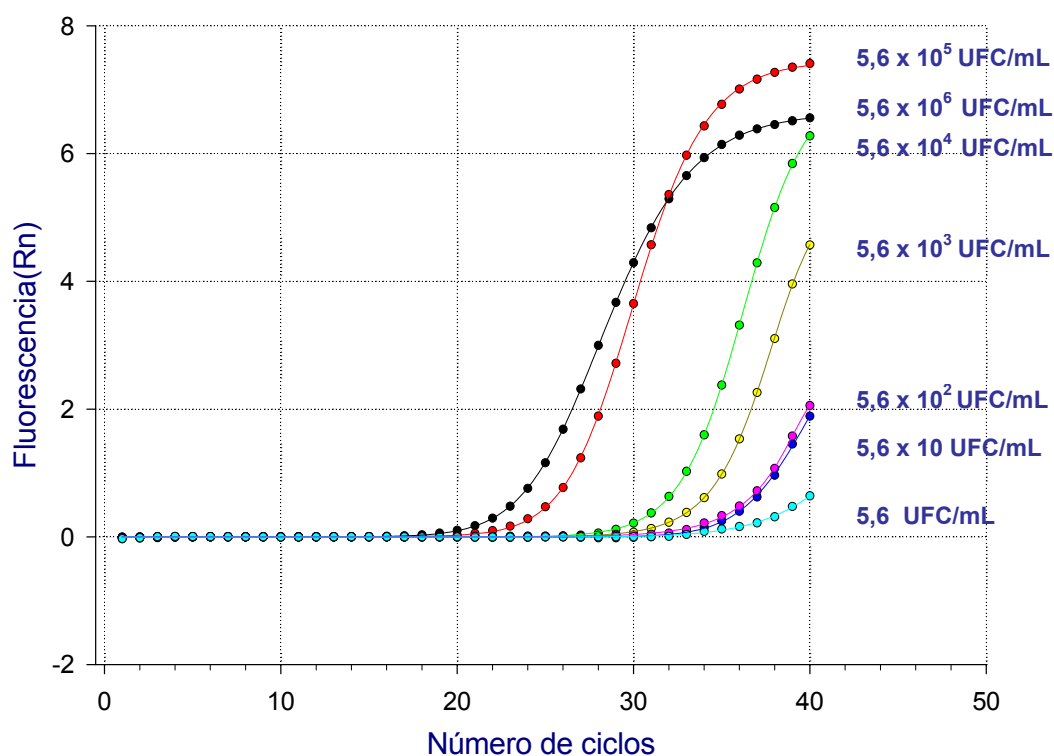


Figura 16. PCR a tiempo real con SYBR-Green, específica para *S. cerevisiae* (cepa CECT 1485). La curva representa los cambios de fluorescencia frente a los ciclos de amplificación de diluciones seriadas 10^{-1} , a partir de células de la cepa CECT 1485. Las concentraciones se expresan en UFC/mL..

5.2.3. Eficiencia en la amplificación.

En el sistema de PCR a tiempo real diseñado, el éxito en la cuantificación de células es dependiente de la linealidad y la eficiencia de la PCR. En nuestro estudio, la linealidad se estableció mediante el coeficiente de correlación (R^2) de la curva de regresión obtenida a partir de diluciones de células de concentración conocida. La eficiencia de la reacción (E), se estableció mediante la ecuación: $E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$.

Los valores de C_t obtenidos para concentraciones (en número de células) entre $5,8 \times 10^6$ UFC/mL y $5,8$ UFC/mL mostraron una buena linealidad (Figura 17). El gráfico de amplificación generó una pendiente de $-3,53$ con un coeficiente de correlación de $0,990878$ y una eficiencia de $0,92$.

El ensayo fue lineal a lo largo de 6 órdenes de magnitud. Estos resultados indican que sólo en este rango de concentraciones es posible cuantificar de una manera precisa muestras de concentración desconocida.

Así mismo, se estudió la reproducibilidad del método mediante comparación de 8 rectas patrón obtenidas de experimentos independientes en medio GPY. Como resultado, se observó un paralelismo en el análisis de regresión lineal (Figura 18), y los valores de los intervalos de confianza para la intersección (con el eje de valores Y) y la pendiente de cada recta estándar resultaron comparables (Tabla 28).

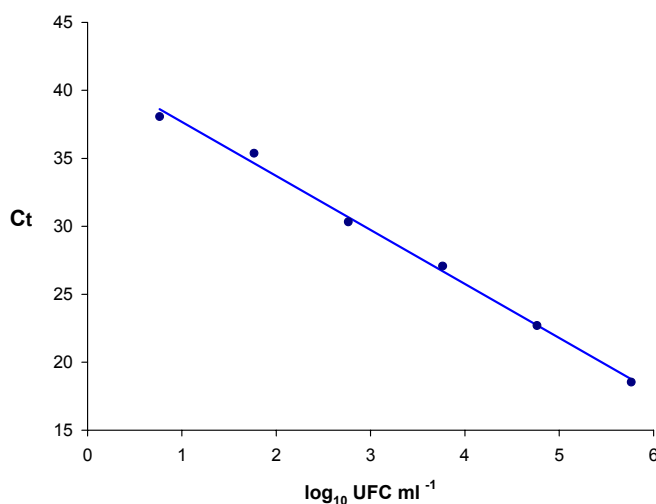


Figura 17. Recta estándar obtenida a partir de un cultivo de *S. cerevisiae* en medio GPY y muestra de la correlación entre el número de ciclos (C_t) y las UFC/mL iniciales (\log_{10} UFC/mL). Los valores de C_t mostrados representan la media de 3 réplicas. $R^2 = 0,990$; Pendiente = $-3,53$.

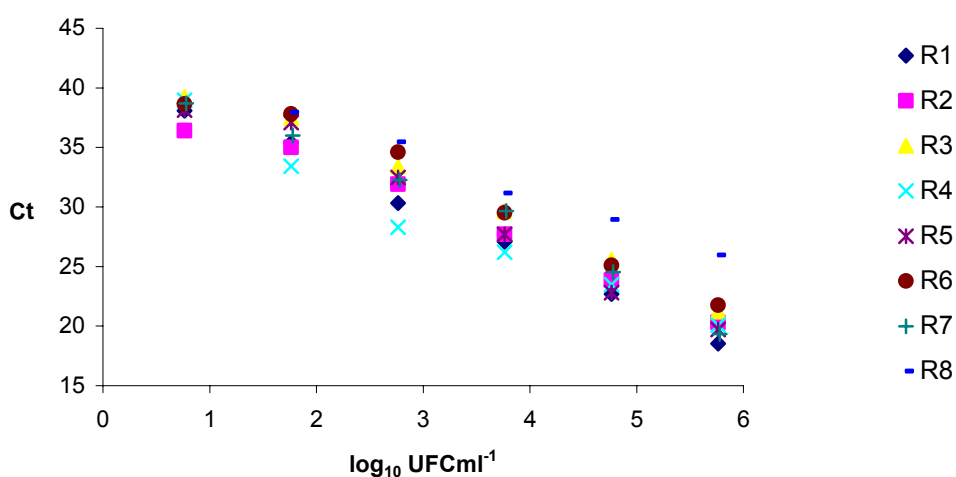


Figura 18. Reproducibilidad de las rectas patrón en medio GPY, construidas en ensayos independientes. R: regresión.

Tabla 28. Intervalos de confianza de la intersección y la pendiente de cada recta patrón obtenida a partir de cultivos en medio GPY.

Matriz	Recta estándar	Intervalo de confianza de la intersección	Intervalo de confianza de la pendiente
Medio GPY	1	41,64 ± 1,30	-3,96 ± 0,35
	2	40,20 ± 2,25	-3,37 ± 0,61
	3	43,13 ± 2,01	-3,69 ± 0,54
	4	40,18 ± 3,23	-3,61 ± 0,88
	5	42,67 ± 2,92	-3,99 ± 0,79
	6	43,13 ± 3,26	-3,64 ± 0,88
	7	42,60 ± 2,18	-3,82 ± 0,71
	8	43,36 ± 2,02	-3,05 ± 0,54

Se consideró significativo un nivel de $P < 0,05$.

5.2.4. Cuantificación (correlación entre PCR a tiempo real y la técnica de recuento en placa).

Se analizó la capacidad de cuantificación del método mediante correlación con el número de células estimado por recuento en placa y por PCR a tiempo real. Mediante diluciones seriadas de una suspensión de células en vino dulce (Moscatel) y medio GPY, se obtuvieron muestras de concentración conocida, determinándose la población de *S. cerevisiae* mediante PCR a tiempo real y recuento en placa. En la Figura 19 se muestra la buena correlación obtenida entre los resultados de las dos técnicas de cuantificación. Así, a partir del análisis de regresión, se obtuvieron valores altos de R^2 , 0,983 en el ensayo realizado a partir de GPY, y 0,999, 0,999 y 0,991 en los tres ensayos independientes realizados a partir de cultivos en vino dulce Moscatel.

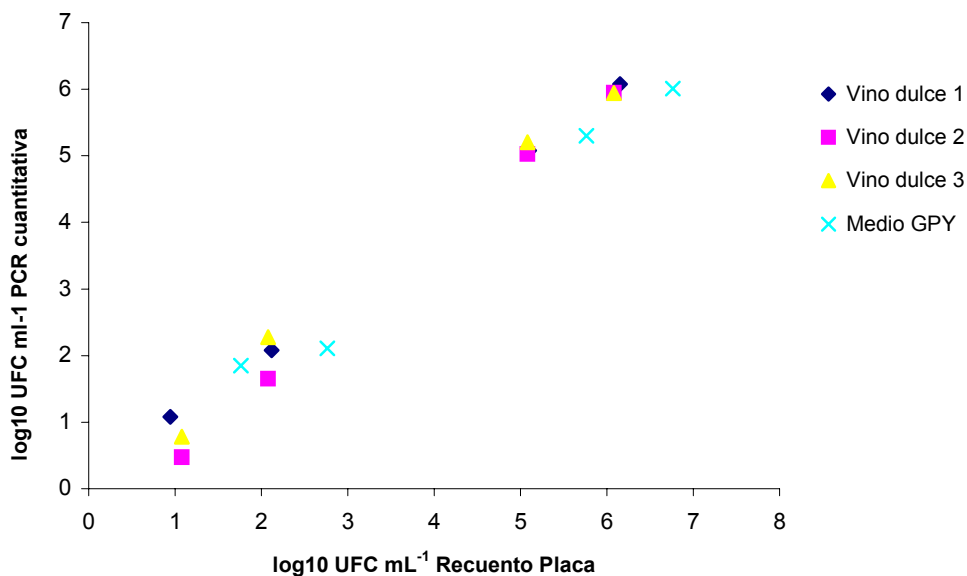


Figura 19. Correlación obtenida en el recuento de células de *S. cerevisiae* en vino dulce y GPY mediante PCR a tiempo real y recuento en placa.

5.3. PCR a tiempo real en vino.

5.3.1. Muestras de vino contaminadas artificialmente.

5.3.1.1. Detección y sensibilidad.

Se evaluó la capacidad de detectar células de *S. cerevisiae* en vino mediante PCR a tiempo real. Para ello, se examinaron 2 vinos comerciales diferentes, dulce y tinto. Para los análisis, el vino dulce se contaminó artificialmente con $6,8 \times 10^6$; $6,8 \times 10^3$ y $6,8 \times 10$ UFC/mL y el vino tinto con 5×10^4 , 5×10^2 y 5×10 UFC/mL. En ambos casos, la PCR a tiempo real mostró una amplificación positiva en todas las muestras contaminadas.

Además, se valoró el límite de detección de células de *S. cerevisiae* en vino. Como se describe en el apartado 8.5.5. de Materiales y Métodos, se inocularon células de la cepa *S. cerevisiae* CECT 1485 en muestras de vino para generar curvas patrón con un rango de $3,8 \times 10^6$ a $3,8$ UFC/mL en vino dulce y de 5×10^6 a 5 UFC/mL en vino tinto. El sistema de PCR fue capaz de detectar hasta $3,8$ UFC/mL en vino dulce y 5 UFC/mL en vino tinto. Si se comparan estos valores con aquellos obtenidos a partir de cultivos en medio GPY ($5,6$ UFC/mL), se podría concluir que la presencia de vino en las muestras no influye en la sensibilidad del ensayo de PCR a tiempo real desarrollado.

Se llevaron a cabo experimentos de enriquecimiento con objeto de establecer el tiempo mínimo necesario para incrementar la sensibilidad de la detección en muestras de vino. Los resultados mostraron que, tras 10 horas de enriquecimiento, *S. cerevisiae* se detectaba en vino dulce cuando se partía de una concentración inicial de $0,8$ UFC/mL. Cuando el cultivo se encontraba en concentraciones entre $0,03$ y $0,4$ UFC/mL en vino dulce, se requerían 12 horas de enriquecimiento. En el caso del vino tinto, después de 8 horas de enriquecimiento, la levadura se detectó en la muestra con $0,8$ UFC/mL y el resto de muestras después de 12 horas.

5.3.1.2. Efecto de la presencia de DNA contaminante.

Se estudió la influencia de la presencia de DNA contaminante en la cuantificación de células de *S. cerevisiae* en vino. Durante la fase final de elaboración del vino, otras levaduras o bacterias (lácticas y acéticas) pueden estar presentes en elevados niveles. Por eso, se incluyeron en este ensayo una cepa de la especie *D. bruxellensis* (CECT 1451^T) como levadura representativa, y *O. oeni* (CECT 217^T) y *A. aceti* (CECT 298^T) como bacterias láctica y acética respectivamente. Como se describe en Materiales y

Capítulo 5

Métodos, se combinaron dos concentraciones de células (10^2 y 10^6 UFC/mL) de *S. cerevisiae* con dos concentraciones del microorganismo contaminante (10^2 y 10^6 UFC/mL). El DNA obtenido se sometió a PCR a tiempo real, y posteriormente se aplicó a los valores de *Ct* resultantes un test ANOVA con un grado de confianza del 5%. El P-valor obtenido en cada caso (0,4565; 0,8294; 0,0688) en el test ANOVA, indica que la presencia de DNA levadura o bacteria no afecta significativamente a la cuantificación del número de células de *S. cerevisiae*. Además, se obtuvieron P-valores a partir del análisis de la interacción entre el número de células de *S. cerevisiae* y el microorganismo contaminante. En los tres casos los P-valores fueron mayores de 0,05 (0,5058; 0,6398; 0,4138), indicando que la presencia de otro microorganismo no tiene ningún efecto en la cuantificación, independientemente de la concentración de *S. cerevisiae*, como se muestra en la Figura 20.

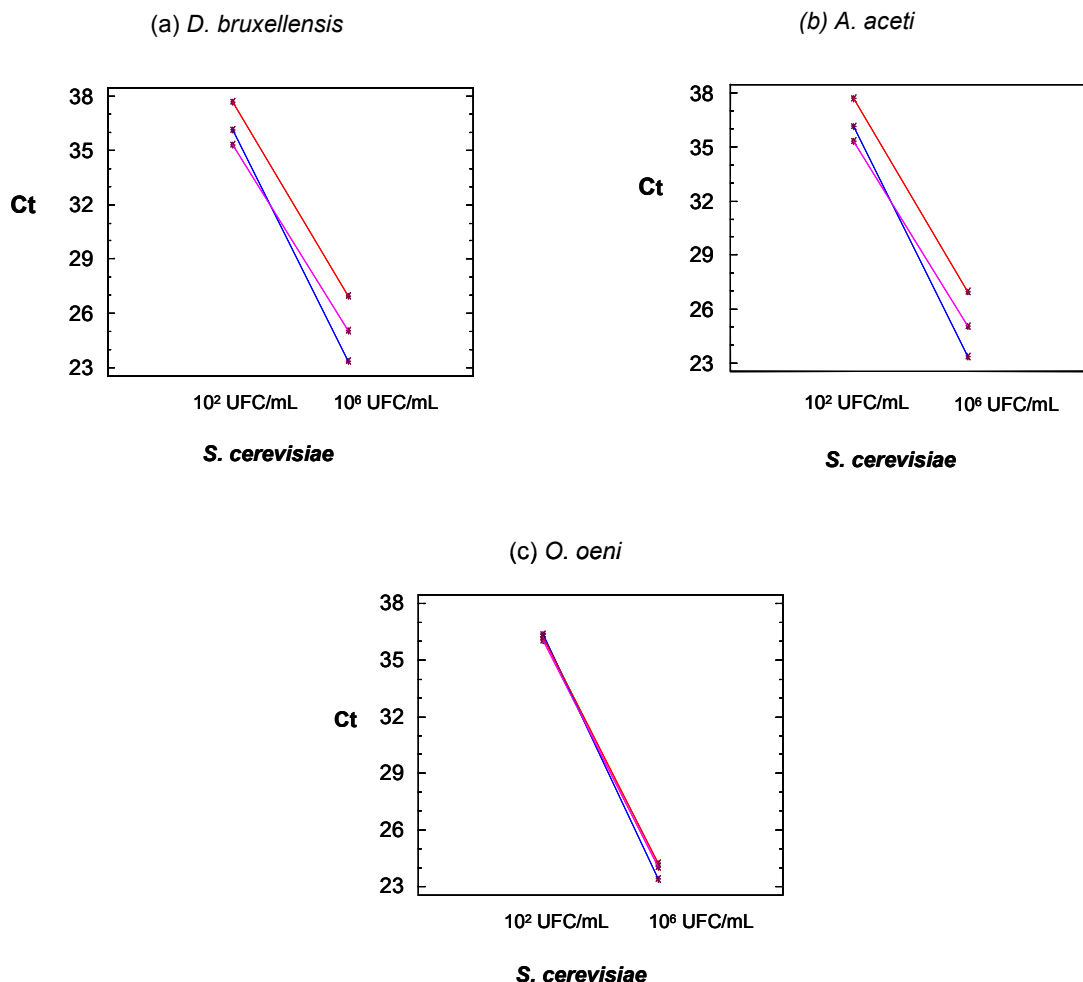


Figura 20. Interacción entre las células de *S. cerevisiae* y las células de *D. bruxellensis* (a), *A. aceti* (b) y *O. oeni* (c) presentes en muestras de vino. Muestras que no contenían microorganismo contaminante (—), muestras que contenían 10^2 UFC/mL de cada microorganismo (—), muestras con 10^6 UFC/mL de cada microorganismo (—).

5.3.1.3. Influencia del vino en la eficiencia del sistema de PCR a tiempo real.

Se compararon rectas patrón obtenidas a partir de medio GPY con rectas patrón construidas a partir de vino. La recta obtenida con el vino dulce mostró una buena linealidad ($R^2 = 0,990$) para concentraciones comprendidas entre $3,8 \times 10^5$ UFC/mL y $3,8$ UFC/mL, con una eficiencia de 0,882. En el caso del vino tinto, la recta patrón mostró una buena linealidad ($R^2 = 0,996$) para concentraciones entre 5×10^6 UFC/mL y 50 UFC/mL, con una eficiencia de 0,7939. Se observó paralelismo entre ambas rectas y la obtenida a partir de cultivos en medio GPY (Figura 21). Sin embargo, se observó además que en el caso del vino dulce y tinto, el valor de C_t de cada dilución fue mayor que el equivalente en la muestra obtenida en medio GPY. Estos resultados sugieren que el vino contiene sustancias que inhiben la reacción de PCR, lo que provocaría a una subestimación del número de células. Este efecto fue mayor en el caso del vino tinto.

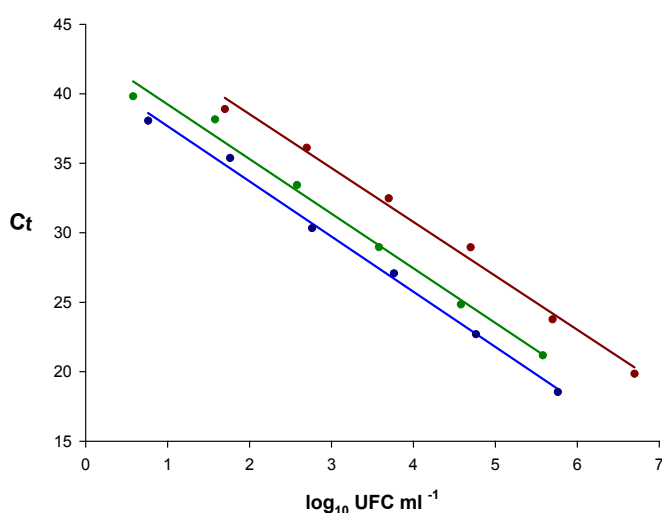


Figura 21. Rectas estándar obtenidas a partir del cultivo de *S. cerevisiae* en medio GPY (azul), vino dulce (verde) y vino tinto (rojo).

5.3.1.4. Reproducibilidad del método en vino.

Se analizó la reproducibilidad del sistema de PCR a tiempo real en vino dulce y tinto. Para ello, se construyeron 4 rectas patrón para ambas matrices, en experimentos diferentes. Como resultado, se observó un paralelismo entre las regresiones de cada recta construida con vino dulce (Figura 22) y vino tinto (Figura 23). Además, los valores

Capítulo 5

de los intervalos de confianza de la intersección y la pendiente, calculados mediante un test *t*-Student, fueron en todos los casos comparables (Tabla 29).

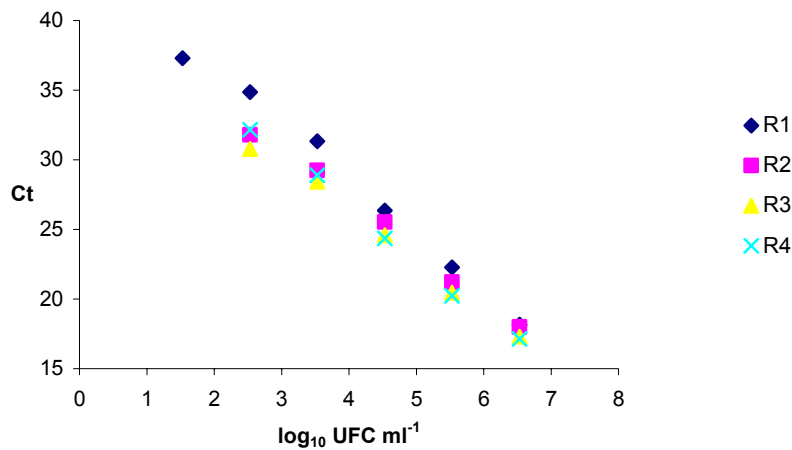


Figura 22. Reproducibilidad de las rectas patrón construidas en vino dulce (Moscatel), a partir de ensayos independientes. R: regresión.

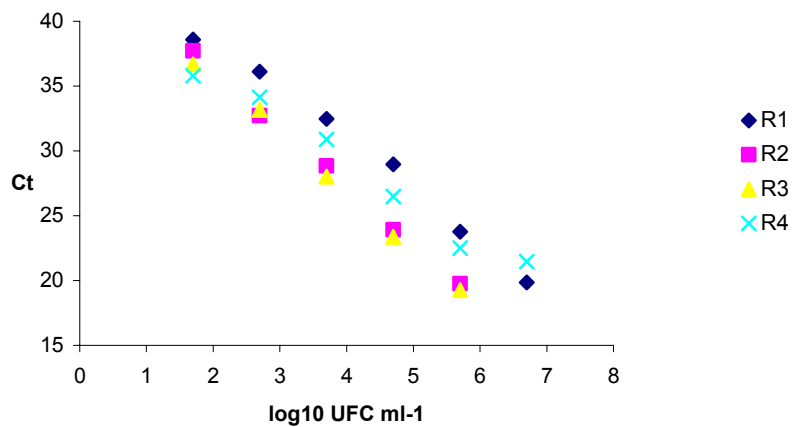


Figura 23. Reproducibilidad de las rectas patrón construidas en vino tinto (Bobal/Monastrell), a partir de ensayos independientes. R: Regresión.

Tabla 29. Intervalos de confianza de la intersección y la pendiente de cada curva estándar obtenida a partir de vino dulce (Moscatel) y vino tinto (Bobal/Monastrell).

Matriz	Curva estándar	Intervalo de confianza de la intersección	Intervalo de confianza de la pendiente
Vino dulce (Moscatel)	1	44,33 ± 2,19	-3,95 ± 0,50
	2	41,30 ± 2,42	-3,56 ± 0,50
	3	40,16 ± 2,54	-3,49 ± 0,53
	4	42,09 ± 2,13	-3,89 ± 0,45
Vino tinto (Bobal/Monastrell)	1	46,06 ± 2,47	-3,83 ± 0,54
	2	45,01 ± 1,17	-4,47 ± 0,29
	3	44,06 ± 1,71	-4,46 ± 0,41
	4	41,86 ± 3,10	-3,17 ± 0,68

Se consideró significativo un nivel de $P < 0,05$.

5.3.2. Muestras de vino con contaminación real.

El sistema de PCR a tiempo real desarrollado se aplicó a 8 muestras de vino tinto proporcionadas por una bodega española, 7 botellas y 1 envase “bag in box” de vino tinto. Dichas muestras presentaban emisión de gas por lo que se sospechó una alteración microbiana, muy probablemente por levaduras. En todos los casos, se obtuvo una curva de disociación con una T_m de 78,5 °C, correspondiente a la especie *S. cerevisiae*, sin que se determinaran amplificaciones inespecíficas. Este resultado se confirmó analizando 5 colonias, aisladas de una de las botellas, mediante restricción de la región ribosómica 5,8S-ITS. Como resultado, los 5 aislados mostraron un producto de amplificación de 850 pb previamente descrito para la especie *S. cerevisiae* (Esteve-Zarzoso y col., 1999). Además, los patrones de restricción obtenidos con tres endonucleasas (*CfoI*: 375+325+150, *HaeIII*: 325+230+170+125 y *HinfI*: 375+365+110) revelaron la identidad de estas cepas como *S. cerevisiae*.

En un ensayo diferente, el DNA obtenido de cada muestra de vino alterado se sometió a cuantificación en el sistema de PCR a tiempo real. Los valores de C_t obtenidos se extrapolaron en la correspondiente recta patrón de DNA (de vino artificialmente

Capítulo 5

inoculado), cuyas concentraciones variaban desde 5×10^6 UFC/mL hasta 50 UFC/mL. Los valores de concentración resultantes se resumen en la Tabla 29.

Simultáneamente, se realizó un recuento de placa a partir de 10 mL de muestra de vino contaminado. Sorprendentemente, el recuento de células reveló la presencia de contaminación sólo en una de las muestras analizadas (B1). En este caso, la correlación entre el número de UFC determinada por recuento en placa ($1,8 \times 10^5$ UFC/mL) y por PCR a tiempo real ($1,31 \times 10^5$ UFC/mL) fue excelente. La no correlación entre recuento de células y PCR a tiempo real en el resto de muestras es indicativo de la presencia de células muertas o no cultivables de *S. cerevisiae*.

Tabla 30. Cuantificación de *S. cerevisiae* en muestras de vino con contaminación real mediante recuento en placa y PCR a tiempo real.

Designación muestra de vino ^a	Método de cuantificación ^b	
	Recuento en placa	PCR a tiempo real
B1	$1,88 \times 10^5$	$1,31 \times 10^5$
B2	nd	$7,80 \times 10^3$
B3	nd	$6,80 \times 10^2$
B4	nd	$1,32 \times 10^3$
B5	nd	$5,19 \times 10^2$
B6	nd	$2,50 \times 10^2$
P1	nd	$4,80 \times 10^2$

^a Muestras de vino (Bobal y Monastrell) tomadas de botellas (B) o “bag in box” (P); ^b Valores en UFC/mL; nd: no se detectó crecimiento

5.4. Discusión.

La PCR a tiempo real ha sido aplicada para detectar de forma rápida y sensible y en algunos casos, para cuantificar, un gran número de especies bacterianas asociadas a alimentos. Sin embargo, hay pocos trabajos que aborden este tipo de estudios en levaduras, probablemente porque durante décadas se han considerado inocuas para los humanos. Este es el caso de *S. cerevisiae*, una especie de levadura que frecuentemente se usa en la industria para la producción de alimentos y bebidas. Por esta razón, los sistemas de PCR desarrollados para la detección de *S. cerevisiae* se han centrado en el seguimiento a nivel de cepa en fermentaciones inoculadas y naturales (de Barros Lopes y col., 1996; López y col., 2002; Ness y col., 1993). Sin embargo, *S. cerevisiae* es también capaz de producir alteración en alimentos y bebidas, especialmente en bebidas alcohólicas y refrescos (Deak y Beuchat, 1996), e incluso desarrollar infecciones en humanos (Murphy y Kanavagh, 1999). Actualmente existe un interés creciente en la detección de levaduras alterantes, por las consecuencias económicas que se derivan de su actividad en los alimentos (Loureiro y Querol, 1999). Por ello, es necesario abordar métodos de identificación a nivel de especie. Los sistemas basados en PCR se describen como los más apropiados para la detección de estas especies de levadura. Este es el caso de la restricción de la región ribosómica 5,8S-ITS (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Fernández-Espinar y col., 2000) y del gen MET2 (Masneuf y col., 1996) y la amplificación de "intron splice sites" (de Barros Lopes y col., 1998), pero no abordan la enumeración de levaduras como la PCR a tiempo real. Es por ello que resulta de gran interés desarrollar este tipo de sistemas. Además, la técnica de PCR a tiempo real presenta otras ventajas frente a estas técnicas, ya que evita los pasos de digestión y electroforesis, siendo así un método más rápido. Otra novedad que introduce el método es que la extracción de DNA se puede realizar directamente a partir de vino, sin un aislamiento previo del cultivo, contribuyendo a un acortamiento en el tiempo de detección. Esto es posible debido a su mayor sensibilidad, pudiéndose detectar pequeñas cantidades de DNA inicial en comparación con las técnicas tradicionales de PCR. Además, el tiempo necesario para obtener un resultado final mediante PCR a tiempo real es muy corto, de aproximadamente 5 horas (entre 2 y 3 horas para la extracción y precipitación de DNA en función del número de muestras, y 3 horas para la reacción de PCR a tiempo real). Esta ventaja permite a las industrias de alimentación realizar intervenciones más efectivas.

El límite de detección del sistema de PCR puede cambiar en función de la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. En el presente estudio, se utilizó un amplificado obtenido por RAPD-PCR como secuencia diana para la detección y

cuantificación de *S. cerevisiae*, ya que permitía la diferenciación de esta especie de otras del complejo *Saccharomyces sensu stricto*, asociadas a alimentos (Martorell y col., 2005d). Los oligonucleótidos diseñados SC1d y SC1r, mostraron una elevada especificidad para *S. cerevisiae*. Además, fue posible detectar hasta 5,6; 3,8 y 5 UFC/mL en cultivos en GPY, en vino dulce y tinto respectivamente sin necesidad de enriquecimiento. Este límite de detección resultó ser bastante bueno, y es similar al obtenido para otros microorganismos en ensayos similares. Este es el caso del ensayo de PCR a tiempo real para la detección y enumeración de *Dekkera bruxellensis* en vino (Phister y Mills, 2003). Estos autores mostraron un nivel de detección de 1 UFC/mL, y no observaron diferencias cuando el DNA era extraído de medio rico, vino o vino inoculado con *S. cerevisiae*. Actualmente, no existe una normativa legal en cuanto al número de levaduras admitidas en vino, únicamente unas recomendaciones propuestas por la OIV (The Office International de la Vigne et du Vin), (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). La OIV, sugiere que una carga microbiana menor a 10^4 - 10^5 UFC/mL en el caso de microorganismos que producen sedimentos en suspensión, o menos de 10^2 - 10^3 UFC/mL para microorganismos que producen sedimentos floculantes. Por debajo de estos niveles, puesto que no se aprecia turbidez, consideran que el vino es aceptable. Teniendo en cuenta estas observaciones, el método desarrollado puede considerarse apto, ya que la mínima cantidad de células que permite detectar está por debajo de las recomendaciones de la OIV. En el caso de requerir mayor sensibilidad en la detección, se puede recurrir a cultivos de enriquecimiento. De esta manera, en 12 horas se pueden detectar hasta 3 células en 100 mL de vino.

La posibilidad de detectar un bajo número de células y así confirmar la ausencia de *S. cerevisiae*, es particularmente importante para evitar la alteración durante el almacenamiento del vino antes de su comercialización. La contaminación inicial con un bajo número de células puede ser una causa potencial de alteración. Otro aspecto de los programas de prevención es la capacidad de detectar cuantitativamente, para poder estimar el riesgo de contaminación por *S. cerevisiae* en muestras de vino. Hasta el momento no se han abordado estudios de PCR cuantitativa para el caso de *S. cerevisiae*, por lo que resulta de gran interés poder optimizar una técnica molecular que permita su cuantificación. Los datos obtenidos a partir del análisis de regresión lineal de las rectas patrón construidas con células procedentes de medio GPY y vino, indicaron una buena correlación entre la cantidad de muestra (log de células introducidas) y la cantidad de producto de amplificación (representado por las C_T s). Como resultado, la cuantificación fue precisa para valores de concentración comprendidos entre $5,8 \times 10^6$ y 5,8 UFC/mL para GPY y entre $3,8 \times 10^5$ a 3,8 UFC/mL y 5×10^6 a 50 UFC/mL en vino dulce y tinto

respectivamente. Sin embargo, cuando se valoró la cuantificación en muestras de vino, el número de células resultó en ocasiones subestimado. Esto es debido a la presencia de sustancias inhibitoras presentes en el vino, que pueden afectar a la reacción de PCR, a pesar de la adición de BSA en la mezcla de reacción. La capacidad del BSA para disminuir la inhibición podría estar relacionado con su unión a inhibidores (Rådström y col., 2003). Algunos autores ya han destacado una clara diferencia entre los resultados obtenidos con DNA procedente de cultivos puros, y aquellos cuyo DNA procede directamente de la matriz alimentaria. Es el caso de Delaherche y colaboradores (2004), que muestran una capacidad de detección para su sistema de PCR a tiempo real muy baja, no pudiéndose determinar niveles de contaminación por *Dekkera bruxellensis* por debajo de 10^4 UFC/mL en vino, debido a la presencia de polifenoles o taninos. Phister y Mills (2003), mostraron que una dilución 10^{-1} de DNA en agua antes de la PCR a tiempo real, reducía la variabilidad en los resultados obtenidos a partir de vino tinto, dando lugar a una mejor correlación con los resultados mediante recuento en placa. Sin embargo, esta práctica produce una disminución en el límite de detección (Phister y Mills, 2003), por lo que en el presente trabajo preferimos cuantificar las muestras de vino extrapolando a rectas patrón construidas con la misma matriz (vino dulce o tinto). De esta forma, el sistema desarrollado permitió la detección y cuantificación de células de *S. cerevisiae* en vinos alterados proporcionados por una bodega española. De las 8 muestras analizadas, 7 no presentaron crecimiento de levaduras en placas de recuento. Este resultado pone de manifiesto el problema que plantean los sistemas de PCR para diferenciar entre células vivas de muertas.

Los sistemas de PCR a tiempo real basados en la transcripción reversa suponen una buena alternativa para evitar el problema de falsos positivos resultantes de la amplificación de DNA de células muertas (Sheridan y col., 1998). Esto es debido a que la detección de RNAm está considerada como mejor indicador de viabilidad celular (Keer y Birch, 2003). En nuestro caso, el producto de RAPD clonado que sirvió para el diseño de los oligonucleótidos, correspondía al gen NMD3 que codifica una proteína citoplasmática esencial para la estabilidad de las subunidades ribosómicas de *S. cerevisiae* (Ho y Johnson, 1999). Desafortunadamente, uno de los oligonucleótidos seleccionados, SC1d, era homólogo a la región intergénica y por tanto, no resultó útil para transcripción reversa. Puesto que SC1d contiene parte del extremo terminal 3' del cebador usado para la amplificación por RAPD (OPA 7), era esencial en la reacción de PCR para mantener la especificidad y por tanto insustituible por otro oligonucleótido. A pesar de este inconveniente, la detección de células muertas puede resultar interesante para estimar el riesgo de alteraciones organolépticas como consecuencia de la actividad de las células

antes de su muerte. En este sentido, podría ser interesante conocer cual es la concentración mínima necesaria para que *S. cerevisiae* cause en el vino efectos indeseables. Esto se ha estudiado ya en otras especies de levadura, como *Brettanomyces*, donde se detectan olores típicos indeseables cuando la concentración de células supera 10^5 UFC/mL (Chatonnet y col., 1992). Por tanto, nuestro sistema de PCR a tiempo real basado en la detección de DNA permite determinar el problema de la contaminación, pudiéndose utilizar como herramienta de diagnóstico en los laboratorios de microbiología de alimentos.

Por otra parte, existen evidencias de la presencia de células viables no cultivables de *S. cerevisiae* y otras especies durante el proceso de envejecimiento del vino (Divol y Lonvaud-Funel, 2005). Estas formas no cultivables se inducen probablemente por factores de estrés, tales como la adición de SO_2 al mosto durante la fermentación alcohólica. Teniendo esto en cuenta, el protocolo de PCR a tiempo real desarrollado podría ser de gran interés para detectar y cuantificar estas células, que no se detectarían por métodos tradicionales como el recuento en placa.

La detección directa de *S. cerevisiae* en vino mediante PCR a tiempo real utilizando el juego de oligonucleótidos diseñados en este estudio, resultó ser sensible y reproducible, permitiendo la enumeración de células en un corto periodo de tiempo (4-5 h). No existen regulaciones nacionales o internacionales, sin embargo el límite de detección es suficiente y cumple las recomendaciones de la OIV, cubriendo así las necesidades de las bodegas. Aunque el método descrito en este estudio se ha realizado en muestras de vino, se pueden llevar a cabo adaptaciones en otro tipo de alimentos donde *S. cerevisiae* supone un riesgo de alteración.

Conclusiones

1. Se propone la identificación y diferenciación de las especies del género *Debaryomyces* mediante secuenciación de distintas regiones. Así, las especies *D. carsonii*, *D. etchellsii*, *D. maramus*, *D. melissophilus*, *D. occidentalis* y *D. yamadae*, pueden identificarse mediante comparación de las secuencias de la región 5,8S-ITS. En el caso de las especies *D. castellii*, *D. coudertii*, *D. hansenii*, *D. nepalensis*, *D. polymorphus*, *D. pseudopolymorphus*, *D. robertsiae*, *D. udenii* y *D. vanriijae* se propone la comparación de secuencias del gen de la actina (ACT1).

2. La aplicación de técnicas moleculares, ha permitido resolver un problema industrial de alteración por levaduras en un turrón de frutas confitadas. Se ha identificado que la levadura responsable de la alteración pertenece a la especie *Zygosaccharomyces bailii* y que sólo está presente en la fruta del turrón alterado, pero no en el mazapán; demostrándose que los jarabes utilizados en la industria elaboradora de dichas frutas, fueron el origen de la contaminación.

3. Las especies *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii* y *Sporobolomyces roseus* también son levaduras que potencialmente pueden producir alteración en frutas confitadas o productos elaborados con las mismas, ya que todas fueron aisladas a lo largo de la cadena de producción de la empresa que elaboró dichas frutas.

4. Se ha demostrado mediante estudios fisiológicos, que las cepas de *Z. bailii* y *Z. rouxii* aisladas de jarabe y turrón poseen elevada resistencia a conservantes de tipo ácido débil y a desinfectantes, así como una extrema osmotolerancia y capacidad de adaptación a altas concentraciones de glucosa. Estas características, junto con su capacidad de crecimiento a pH bajo y una elevada fermentación de la glucosa con extraordinaria producción de gas, permiten justificar su presencia en las frutas confitadas, jarabes y turrón y explicar la alteración producida en las mismas.

5. La identificación molecular de 95 cepas de levadura con capacidad para producir olores fenólicos en medio diferencial DBDM, ha mostrado por primera vez la presencia de cepas pertenecientes a la especie *Pichia guilliermondii* en vinos. Además, los niveles de 4-etilfenol producidos por dichas cepas fueron del mismo orden que los producidos por cepas de la especie *Dekkera bruxellensis*, indicando, por tanto, que ambas especies de levaduras pueden ser responsables de olores desagradables, que recuerdan a establo y a cuero en vinos alterados. En el caso de *P. guilliermondii*, se ha observado una relación

Conclusiones

entre los patrones obtenidos con la técnica de análisis de restricción del mtDNA y la producción de 4-etilfenol. En concreto, sólo las cepas con patrón F o G producen elevados niveles de este compuesto y por tanto, estos patrones podrían utilizarse como un indicador molecular de la presencia en el vino de cepas con capacidad alterante.

6. La tipificación de los aislados pertenecientes a la especie *D. bruxellensis* mediante las técnicas de análisis de restricción del mtDNA y RAPD-PCR permitió determinar que la contaminación del vino por esta especie se produce antes del envejecimiento del mismo en la bodega, y que los insectos actúan como vectores de propagación de la levadura en la bodega. Así mismo, la tipificación de los aislados pertenecientes a la especie *P. guilliermondii* indicó un origen externo de contaminación por esta especie en la bodega. La detección de los focos de contaminación permite a las empresas la adopción de medidas correctoras.

7. El desarrollo de un sistema de PCR a tiempo real con SYBR-green como agente fluorescente permite la detección, de forma rápida y específica, de la especie *S. cerevisiae* en vinos alterados por dicha levadura. El método es reproducible y muy sensible permitiendo la detección, como mínimo, de 3,8 y 5 UFC de *S. cerevisiae* por mL de vino dulce o tinto respectivamente, siendo esta sensibilidad suficiente para satisfacer las exigencias de los bodegueros. Además también es útil para cuantificar de forma precisa el número de células de *S. cerevisiae* presentes en el vino, lo que permite estimar el riesgo de alteración del vino durante su almacenamiento y distribución. Además, el sistema se puede extender a otros alimentos y bebidas donde *S. cerevisiae* puede causar alteración.

Listado de Tablas y Figuras

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1. Especies de levadura más significativas y comúnmente descritas como alterantes de alimentos	4
Tabla 2. Alimentos específicos y levaduras alterantes asociadas	5
Tabla 3. Principales conservantes químicos utilizados en la industria alimentaria y su regulación según la normativa europea vigente	11
Tabla 4. Trabajos recientes donde se aplican técnicas moleculares para la identificación de levaduras asociadas a alimentos y bebidas	20
Tabla 5. Técnicas moleculares más frecuentemente utilizadas para la caracterización de cepas de levadura asociadas a alimentos y bebidas	27
Tabla 6. Medios de cultivo cromogénicos desarrollados recientemente para la diferenciación y enumeración de levaduras alterantes de alimentos	31
Tabla 7. Trabajos publicados sobre cuantificación de levaduras alterantes de alimentos mediante PCR a tiempo real	44
Tabla 8. Cepas tipo y de referencia del género <i>Debaryomyces</i> y origen de aislamiento	49
Tabla 9. Cepas de referencia de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> y origen de aislamiento	51
Tabla 10. Cepas tipo y de referencia de especies vínicas y alterantes de vinos, y origen de aislamiento	52
Tabla 11. Cepas de levadura alterantes utilizadas en el estudio fisiológico	53
Tabla 12. Cepas pertenecientes a las especies <i>Dekkera bruxellensis</i> y <i>Pichia guilliermondii</i> aisladas de bodegas portuguesas con distinta localización geográfica	54
Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	58
Tabla 14. Conservantes alimentarios utilizados en este estudio	63
Tabla 15. Patrones de restricción obtenidos tras la digestión con tres endonucleasas, y que revelaron algún polimorfismo en la región 5,8S-ITS de las cepas de <i>Debaryomyces</i> analizadas	78

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 16. Números de acceso de las secuencias del GenBank para las cepas tipo del género <i>Debaryomyces</i>	80
Tabla 17. Similitudes de secuencia y diferencias nucleotídicas entre las secuencias de la región 5,8S-ITS de las cepas tipo de las especies del género <i>Debaryomyces</i>	84
Tabla 18. Datos de reasociación de nDNA y similitud de secuencia de la región 5,8S-ITS, de los dominios D1/D2 del gen 26S y el gen ACT1 de las cepas tipo del género <i>Debaryomyces</i> , que no pudieron identificarse mediante restricción o secuenciación directa de la región 5,8S-ITS	85
Tabla 19. Identificación de levaduras y recuento mediante Número Más Probable (NMP) de los aislados de muestras de fruta confitada y turrón alterado	94
Tabla 20. Patrones obtenidos mediante restricción de mtDNA, PCR de microsatélites y RAPD en cepas de referencia de <i>Z. bailii</i>	100
Tabla 21. Patrones obtenidos mediante restricción de mtDNA, PCR de microsatélites y RAPD en cepas de referencia de <i>Z. rouxii</i>	101
Tabla 22 . Osmotolerancia, crecimiento a bajo pH, producción de gas y temperatura de inhibición del crecimiento, analizados en este estudio	110
Tabla 23. Temperatura de inhibición del crecimiento de la cepa <i>Z. bailii</i> CECT 12002, en medios con concentraciones crecientes de glucosa	111
Tabla 24. Concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) de los conservantes y desinfectantes analizados en este estudio.	114
Tabla 25. Patrones de restricción de mtDNA y haplotipos de RAPD obtenidos en las 63 cepas de <i>D. bruxellensis</i> analizadas en este estudio	126
Tabla 26. Producción de 4-etilfenol y patrones obtenidos mediante restricción de mtDNA en las cepas de <i>Pichia guilliermondii</i> analizadas en este estudio	129
Tabla 27. Cepas analizadas en este estudio y resultados de amplificación por PCR a tiempo real con los oligonucleótidos SC1d y SC1r	137
Tabla 28. Intervalos de confianza de la intersección y la pendiente de cada recta patrón obtenida a partir de cultivos en medio GPY	141

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 29. Intervalos de confianza de la intersección y la pendiente de cada recta patrón obtenida a partir de vino dulce (Moscatel) y vino tinto (Bobal/Monastrell)	147
Tabla 30. Cuantificación de <i>S. cerevisiae</i> en muestras de vino con contaminación real mediante recuento en placa y PCR a tiempo real	148
Figura 1. Esquema de la organización de los genes ribosomales.	15
Figura 2. Técnica de PCR a tiempo real.	18
Figura 3. Sistemas de detección en PCR a tiempo real.	33
Figura 4. Modelo de curva de amplificación, mostrando los términos utilizados habitualmente en PCR cuantitativa.	35
Figura 5. Árbol Neighbor-joining basado en las secuencias de la región 5,8S-ITS de las especies tipo de <i>Debaryomyces</i> .	82
Figura 6. Patrones moleculares obtenidos mediante restricción del mtDNA con la endonucleasa <i>Hinfl</i> en cepas de referencia de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> .	97
Figura 7. Ejemplo de patrones obtenidos tras la amplificación de microsatélites en cepas de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> de referencia, con los oligonucleótidos (GTG) ₅ y (GAC) ₅ .	98
Figura 8. Perfiles de RAPD obtenidos con los oligonucleótidos más discriminantes, (a) OPA 10 y OPA 15 (<i>Z. bailii</i>) y (b) OPA 3 (<i>Z. rouxii</i>), y que se detallan en la Tabla 20 y 21.	99
Figura 9. Ejemplo de patrones de restricción de mtDNA con <i>Hinfl</i> que mostraron las cepas de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> , aisladas de las frutas confitadas y de turrón alterados.	103
Figura 10. Ejemplos de patrones de RAPD que mostraron las cepas de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. rouxii</i> aisladas de frutas confitadas y turrón alterado.	103
Figura 11. Crecimiento de levaduras adaptadas (morado) y no adaptadas (azul) en YPD con glucosa, pH4 a 25°C.	112
Figura 12. Patrones de restricción de mtDNA obtenidos con <i>Hinfl</i> en cepas de <i>D. bruxellensis</i> y <i>P. guilliermondii</i> , descritas en la Tabla 25 y 26.	124

Índice de Tablas y Figuras

Figura 13. Patrones de RAPD obtenidos con los OPA 2, 3 y 9 en las cepas de <i>D. bruxellensis</i> que compartían el patrón A resultante de la restricción del mtDNA (<i>Hinf</i> I).	125
Figura 14. Patrones de RAPD obtenidos con el oligonucleótido de secuencia aleatoria OPA-07 en especies de <i>Saccharomyces</i> sensu stricto.	136
Figura 15. Análisis de la curva de disociación del producto de amplificado de <i>S. cerevisiae</i> .	138
Figura 16. PCR a tiempo real con SYBR-Green, específica para <i>S. cerevisiae</i> (cepa CECT 1485).	139
Figura 17. Recta estándar que muestra la correlación entre el número de ciclos (<i>C_t</i>) y las UFC/ml iniciales (\log_{10} UFC/mL).	140
Figura 18. Reproducibilidad de las rectas patrón en medio GPY, construidas en ensayos independientes.	141
Figura 19. Correlación obtenida en el recuento de células de <i>S. cerevisiae</i> en vino dulce y GPY mediante PCR a tiempo real y recuento en placa.	142
Figura 20. Interacción entre las células de <i>S. cerevisiae</i> y las células de <i>D. bruxellensis</i> (a), <i>A. aceti</i> (b) y <i>O. oeni</i> (c) presentes en muestras de vino.	144
Figura 21. Rectas estándar para <i>S. cerevisiae</i> obtenidas a partir del cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en GPY, vino dulce y vino tinto.	145
Figura 22. Reproducibilidad de las rectas patrón construidas en vino dulce (Moscatel), a partir de ensayos independientes.	146
Figura 23. Reproducibilidad de las rectas patrón construidas en vino tinto (Bobal/Monastrell), a partir de ensayos independientes.	146

Bibliografía

- Aigle M., Erbs, D. y Moll, M. (1984) Some molecular structures in the genome of larger brewing yeast. *Am. Soc. Brew. Chem.* 42: 1-7.
- Alguacil, M., Fidalgo, M., Jiménez, J., Lozano, J.I., Neva, M.A. y Perdignes, F. (1998) Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en instalaciones de vendimia mediante PCR. *Aliment., Equipos Tecnol.*, 81-85.
- Anon. (1989) Council directive on food additives other than colours and sweeteners. (89/107/EEC).
- Anon. (1995). Directiva del parlamento europeo y del consejo sobre aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes (95/2/CE).
- Anon. (2004). General Standard for food additives. Codex stan 192-1995 (rev. 5- 2004).
- Araujo, C., Sousa, M.J., Ferreira, M.F. y Leao, C. (2003) Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. *J. Food Prot.* 66: 625-632.
- Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M. y Parish, M.E. (2002) Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1955-1961.
- Azumi, M. y Goto-Yamamoto, N. (2001) AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast.* 18: 1145-1154.
- Babic, I., Hilbert, G., Nguyen-The, C. y Guiraud, J.(1992) The yeast flora of stored ready-to-use carrots and their role in spoilage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 27: 473-484.
- Baldry, M.G. (1983) The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Bacteriol.* 54:417-423.
- Baleiras Couto, M.M., Vogels, J.T., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H. y van der Vossen, J.M. (1995) Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 525-535.
- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H. y van der Vossen, J.M. (1996a) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 41-46.
- Baleiras Couto, M.M., Hartog, B.J., Huis int't Veld, J.H.J., Hofstra, H. y van der Vossen, J.M. (1996b). Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiol.* 13: 59-67.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (1983) Yeasts: Characteristic and identification. 1st edn, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Bibliografía

- Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, I.J. (1990) *Yeasts: Characteristics and Identification*, 2nd edn, Cambridge University Press, London.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (2000) *Yeasts: characteristics and identification* 3rd edn, Cambridge University Press, Cambridge.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., Garcia, M.D. y Querol, A. (1997) Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 397-408.
- Belloch, C., Barrio, E., Garcia, M.D. y Querol, A. (1998) Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast.* 14: 1341-1354.
- Belloch, C., Querol, A., García, M.D. y Barrio, E. (2000) Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 405-416.
- Bengtsson, M., Karlsson, H.J., Westman, G. y Kubista, M. (2003) A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 31:e45.
- Beuchat, L.R. (1982) Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *J. Food Science.* 47: 1679-1682.
- Beuchat, L.R. (1993). Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 1-14.
- Beuchat, L.R. y Hocking, A.D. (1990). Some consideration when analyzing foods for the presence of xerophilic fungi. *J. Food Prot.* 53: 984-989.
- Beuchat, L.R., Copeland, F., Curiale, M.S., Danisavich, T., Gangar, V., King, B.W., Lawlis, T.L., Likin, R.O., Okwusoa, J., Smith, C.F. y Townsend, D.E. (1998) Comparison of the simplate total plate count method with petrifilm, redigel, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *J. Food Prot.* 61: 14-18.
- Bialek, R., Weiss, M., Bekure-Nemariam, K., Najvar, L.K., Alberdi, M.B., Graybill, J.R. y Reischl, U. (2002) Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real-time PCR assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 461-469.
- Bleve, G., Rizzotti, L.; Dellaglio, F. y Torriani, S. (2003) Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yoghurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4116-2412.

- Boekhout, T. (2005) Biodiversity: gut feeling for yeasts. *Nature*. 434: 449-451.
- Boekhout, T. y Phaff, J. (2003) Yeast biodiversity. En: "Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects". Ed: T. Boekhout y V. Robert. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp: 1-29.
- Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J.W., Hop, W.C., Abeln, E.C., Dromer, F. y Meyer, W. (2001) Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 147: 891-907.
- Bore, E. y Langsrud, S. (2005) Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *J. Appl. Microbiol.* 98: 96-105.
- Borst, A., Theelen, B., Reinders, E., Boekhout, T., Fluit, A.C. y Savelkoul, P.H. (2003) Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida spp.*, including *C. dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1357-1362.
- Bouchez, J.C., Cornu, M., Danzart, M., Leveau, J.Y., Duchiron, F. y Bouix, M. (2004) Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 520-530.
- Brinkman, N.E., Haugland, R.A., Wymer, L.J., Byappanahalli, M., Whitman, R.L. y Vesper, S.J. (2003) Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1775-1782.
- Briones, A.I., Ubeda, J. y Grando, M.S. (1996) Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 369-377.
- Brocklehurst, T.F. y Lund, B.M. (1984). Microbiological changes in mayonnaise-based salads during storage. *Food Microbiol.* 1: 5-12.
- Brocklehurst, T.F. y Lund, B.M. (1985). Yeasts as cause of spoilage of chilled delicatessen salads. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 57-63.
- Bruetschy, A., Laurent, M. y Jacquet, R. (1994) Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 343-345.
- Brul, S., Klis, F.M., de Nobel, H., Oomes, S.J.C.M., Coote, P. y Hellingwerf, K.J. (2003) Yeast stress response to food preservations systems. En: "Yeasts in foods, beneficial and detrimental aspects". Ed: T., Boekhout y V., Robert. CRC Press, Boca Raton, USA. pp: 193-205.
- Bruns, T.D., White, T.J. y Taylor, J.W. (1991) Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 524-564.

Bibliografía

- Bu, R., Sathiapalan, R.K., Ibrahim, M.M., Al-Mohsen, I., Almodavar, E., Gutierrez, M.I. y Bhatia, K. (2005) Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. Med. Microbiol.* 54: 243-248.
- Bundgaard-Nielsen, K. y Nielsen, P.V. (1996) Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *J. Food Protection.* 59: 268-275.
- Burdock, G.A. (1995) Fenaroli's handbook of flavor ingredients. Vol. 2, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London Tokyo.
- Buschini, A., Carboni, P., Furlini, M., Poli, P. y Rossi, C. (2004) Sodium hypochlorite-, chlorine dioxide and peracetic acid- induced genotoxicity detected by the Comet assay and *Saccharomyces cerevisiae* D7 tests. *Mutagenesis.* 19: 157-162.
- Caggia, C., Retuccia, C., Pulvirenti, A. y Giudici, P. (2001) Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 71-73.
- Cai, J., Roberts, I. y Collins, M.D. (1996) Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 542-549.
- Cameron, J.R., Loh, E.Y. y Davis, R.W. (1979) Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell.* 16: 739-751.
- Capece, A., Salzano, G. y Romano, P. (2003) Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 33-39.
- Cappa, F. y Cocconcelli, P.S. (2001) Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 157-160.
- Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. y Zacheo, G. (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1274-1280.
- Carr, J. G. (1984) Spoilage of cider. *J. Appl. Bacteriol.* 57: (Abstr.) x (Issue 3).
- Carreira, A. y Loureiro, V. (1998) A differential medium to detect *Yarrowia lipolytica* in 24 hours. *J. Food. Mycol.* 1: 3-12.
- Caruso, M., Capece, A., Salzano, G. y Romano, P. (2002) Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 323-328.
- Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lepingle, A., Brignon, P., Gnedre, F. y Gaillardin, C. (1998) A family of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry rearrangements involving chromosomes I and III. *Yeast.* 14: 551-561.

- Casas, E., Valderrama, M.J. y Peinado, J.M. (1999) Sorbate detoxification by spoilage yeasts isolated from marzipan products. *Food Technol. Biotechnol.* 37: 87-91.
- Casas E., de Ancos B., Valderrama M.J., Cano P. y Peinado J.M. (2004) Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 1;94:93-6.
- Casey G.D. y Dobson, A.D. (2004) Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice – a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 327-335.
- Casey, G.D. y Dobson, A.D. (2003) Molecular detection of *Candida krusei* contamination in fruit juice using the citrate synthase gene *cs1* and a potential role for this gene in the adaptive response to acetic acid. *J. Appl. Microbiol.* 95: 13-22.
- Chantarapanont, W., Berrang, M.E. y Frank, J.F. (2004) Direct microscopic observation of viability of *Campylobacter jejuni* on chicken skin treated with selected chemical sanitizing agents. *J. Food protection.* 67: 1146-1152.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N. y Pons, M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60: 165-178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D. y Boidron, J.N. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 463-468.
- Chatonnet, P., Viala, C. y Dubourdieu, D. (1997) Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 443-448.
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F. y Martini, A. (2004) Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 85: 159-164.
- Cocolin, L., Bisson, L.F. y Mills, D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 81-87.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. y Comi, G. (2004a) Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1883-1894.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R. y Comi, G. (2004b) Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1347-1355.

Bibliografía

- Cole, M.B., Franklin, J.G. y Keenan, M.H.J. (1987) Probability of growth of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in a model fruit drink system. *Food Microbiol.* 4: 115-119.
- Collins, M.A. y Buick, R.K. (1989). Effect of temperature on the spoilage of stored peas by *Rhodotorula glutinis*. *Food Microbiol.* 6: 135-141.
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 350: 91-92.
- Connel, L., Stender, H. y Edwards, C.G. (2002) Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 322-324.
- Conner, D.E. y Beuchat, L.R. (1984) Sensivity of heat-stressed yeasts to essential oils plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 229-233.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. y Guillamón, J.M. (1997) Analysis of yeast population during alcoholic fermetation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 339-344.
- Cook, N. (2003) The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Microbiol. Methods.* 53: 165-174.
- Cootes, R.L. y Johnson, R. (1980). A fluorescent staining technique for determination of viable and non-viable yeast and bacteria in wineries. *Food Technol.* 32: 522-523.
- Corredor, M., Davila, A.M., Gaillardin, C. y Casaregola, S. (2000) DNA probes specific for the yeast species *Debaryomyces hansenii*: useful tools for rapid identification. *FEMS Microbiol. Lett.* 193: 171-177.
- Cottrell, M., Kovk, J.K.F., Lategam, P.M., Britz, T.Z. (1986) Long chain fatty acid composition as an aid in the classification of the genus *Saccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 166-168.
- Daniel, H.M. y Meyer, W. (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 61-78.
- Daniel, H.M., Sorrell, T.C. y Meyer, W. (2001) Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1593-1606.
- Dassanayake, R.S. y Samaranyake, L.P. (2003) Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. *Crit. Rev. Microbiol.* 29: 1-24.
- Davenport, R.R. (1980a). An outline guide to media and methods for studying yeasts and yeast-like organisms. En: "The biology and activities of yeasts". Ed: F.A., Skinner, S.M., Passmore, y R.R., Davenport. Academic Press, London. pp: 261-268.

- Davenport, R.R. (1980b) Cold-tolerant yeasts and yeast-like organisms. En: "Biology and activities of yeasts". Ed: F.A., Skinner, S.M., Passmore, y R.R., Davenport. The Society for Applied Microbiology Symposium Series No 9, Academic Press, London New York Toronto Sydney San Francisco. pp: 215-230.
- Davenport, R.R. (1996) Forensic microbiology for soft drinks business. *Soft Drinks Manag*: 34-35.
- Davenport, R.R. (1997) Forensic microbiology II. Case book investigations. *Soft Drinks*: 26-30.
- Davenport, R.R. (1998) Microbiology of soft drinks. En: "The chemistry and technology of soft drinks and fruit juices". Ed: P.R., Ashurst. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK y CRC Press, Boca Raton. pp: 197-216.
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A. y Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4514-4520.
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A. y Langridge, P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 279-286.
- de Barros-Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P.A. y Landridge, P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. System. Bacteriol.* 49: 915-924.
- de Boer, E. y Beumer, R.R. (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food. Microbiol.* 50: 119-130.
- de Llanos, R., Fernández-Espinar, M.T. y Querol, A. (2004) Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek.* 85: 175-185.
- de Siloniz, M.I., Valderrama, M.J. y Peinado, J.M. (2000) A chromogenic medium for the detection of yeasts with beta-galactosidase and beta-glucosidase activities from intermediate moisture foods. *J. Food Prot.* 63: 651-654.
- Deák, T. (1991) Foodborne Yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* 36: 179-278.
- Deák, T. (1995) Methods for the detection and identification of yeasts in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 287-292.
- Deak, T. (2001) Identification of yeasts isolated from poultry meat. *Acta Biol. Hung.* 52: 195-200.
- Deák, T. y Beuchat, L.R. (1993) Use of indirect conductimetry for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. *J. Ind. Microbiol.* 12: 301-308.

Bibliografía

- Deák, T. y Beuchat, L.R. (1994) Use of indirect conductimetry to predict the growth of spoilage yeasts, with special consideration of the *Zygosaccharomyces bailii*. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 405-417.
- Deak, T. Y Beuchat, L.R., (1996) Handbook of food spoilage yeast. CRC, Boca Ratón, New York, London, Tokyo.
- Deak, T., Chen, J. y Beuchat, L.R. (2000) Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4340-4344.
- Delaherche, A., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A. (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97: 910-915.
- Demain, A.L., Phaff, H.J. y Kurtzman, C.P. (1998) The industrial and agricultural significance of yeasts. En: "The yeasts, a taxonomic study". Ed: C.P., Kurtzman y J.W., Fell. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp. 157-173.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2003a) Identification of yeasts originated from wine related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20: 567-574.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2003b) Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20: 377-384.
- Dinsdale, G., Lloyd, D. y Jarvis, B. (1995) Yeast viability during cider fermentation- two approaches to the measurement of membrane potential. *J. Inst. Brew.* 101: 655-658.
- Diriye, F.U., Scorzetii, G. y Martini, A. (1993) Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of precessed, frozen foods. *Int. J. Food. Microbiol.* 19: 27-37.
- Divol B, Lonvaud-Funel A. (2005) Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J Appl Microbiol.* 99: 85-93.
- Dlauchy, D., Tornai-Lehoczki, J. y Gábor, P. (1999) Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 445-453.
- Draper, N.R., y Smith, H. (1981) Applied regression analysis. 2nd edn, John Wiley & Sons, Inc.
- Duarte, F.L., Pais, C., Spencer-Martins, I. y Leao, C. (1999) Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1907-1913.

- Egli, C.M. y Henick-Kling, T. (2001) Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 241-247.
- Eigel, A. y Feldmann, H. (1982) Ty1 and delta elements occur adjacent to several tRNA genes in yeast. *EMBO J.* 1: 1245-1250.
- Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods.* 56: 297-314.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C. y Querol, A. (2003) Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 404-411.
- Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M. y Cosentino, S. (2004) Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 51-59.
- Faid, M., Bakhy, K., Anchad, M. y Tantaoui-Elaraki, A. (1995) Almond paste: physiochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. *J. Food Prot.* 58: 547-550.
- Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. y Barrio, E. (2000) RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of "flor" yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 87-97.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. y Querol, A. (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 1-10.
- Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E. y Querol, A. (2003) Genetic variability among species of the *Saccharomyces sensu stricto*. *Yeast.* 20: 1213-1226.
- Fernández-González, M., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F. y Briones, A.I. (2001) Yeast present during wine fermentation: Comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 634-638.
- Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cassand, P. y de Sainte Blanquet, G. (2000) Genotoxicity study of reaction products of sorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3605-3610.
- Fleet, G.H. (1990a) Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 199-211.

Bibliografía

- Fleet, G. H. (1990b). Food spoilage yeasts. En: "Yeast technology". Ed: J. F. T., Spencer. y D. M., Spencer. Springer-Verlag, Berlin. pp. 124-166.
- Fleet, G. (1992) Spoilage yeasts. Crit. Rev. Biotechnol. 12: 1-44.
- Fleet, G.H. (1999) Microorganisms in food ecosystems. Int. J. Food Microbiol. 50: 101-117.
- Food and drug administration (1979) Specific food labelling requirements. Food and drug administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Paragraph 101.22 (a).
- Foschino, R., Gallina, S., Andrighetto, C., Rossetti, L. y Galli, A. (2004) Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. FEMS Yeast Res. 4: 609-618.
- Frade, J.P., Warnock, D.W. y Arthington-Skaggs, B.A. (2004) Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. J. Clin. Microbiol. 42: 2085-2093.
- Fröhlich-Wyder, M.T. (2003). Yeast in dairy products. En: "Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects". Ed: T., Boekhout y V., Robert. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp. 1-29.
- Fugelsang, K. (1997) Wine Microbiology. The Chapman & Hall Enology Library, New York.
- Fung, D.Y. y Liang, C. (1990) Critical review of isolation, detection, and identification of yeasts from meat products. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 29: 341-379.
- Ganga, M.A. y Martínez, C. (2004) Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. J. Appl. Microbiol. 96: 76-83.
- García, T., Mayoral, B., González, I., López-Calleja, I., Sanz, A., Hernández, P.E. y Martín, R. (2004) Enumeration of yeasts in dairy products: a comparison of immunological and genetic techniques. J. Food Prot. 67: 357-364.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrighetto, C., Schirone, M. y Tofalo, R. (2001) A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. FEMS Yeast Res. 1: 161-167.
- Gargouri, A. (1989) A rapid and simple method for the extraction of yeast mitochondrial DNA. Curr. Genet. 15: 235-237.
- Giannoutsou, E.P., Meintanis, C. y Karagouni, A.D. (2004) Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. Bioresour. Technol. 93: 301-306.
- Gibson, B. (1973) The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms. J. Appl. Bacteriol. 36: 365-376.

- Golden, D.A., Beuchat, L.R. y Hitchcock, H.L. (1994) Changes in fatty acid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 293-303.
- Gomes, F.C., Pataro, C., Guerra, J.G., Neves, M.J., Correa, S.R., Moreira, E.S. y Rosa, C.A. (2002) Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strain isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Can. J. Microbiol.* 48: 399-406.
- Goswell, R.W. (1986) Microbiology of table wines. *Dev. Food Microbiol.* 2: 21-65.
- Granchi, L., Ganucci, D., Viti, C., Giovannetti, L. y Vincenzini, M. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 54-58.
- Green, M.D. e Ibe, S.N. (1987) Yeasts as primary contaminants in yoghurts produced commercially in Lagos, Nigeria. *J. Food Prot.* 50: 193-198.
- Grinbaum, A., Ashkenazi, I., Treister, G., Goldschmied-Reouven, A. y Block, C.S. (1994) Exploding bottles: eye injury due to yeast fermentation of an uncarbonated soft drink. *Br. J. Ophthalmol.* 78: 883.
- Guerra, J.B., Araujo, R.A., Pataro, C., Franco, G.R., Moreira, E.S., Mendonca-Hagler, L.C. y Rosa, C.A. (2001) Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentation cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 106-111.
- Guerzoni, E. y Marchetti, R. (1987) Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and the chemical disease markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 1-18.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T. y Querol, A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces SensuStricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 708-714.
- Guillamón, J.M., Sánchez, I. y Huerta, T. (1997) Rapid characterization of wild and collection strains of the genus *Zygosaccharomyces* according to mitochondrial DNA patterns. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 267-272.
- Guillamón, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer ITS region. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392.
- Halford, W.P. (1999) The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. *Nat. Biotechnol.*, 17: 835.

Bibliografía

- Halford, W.P., Falco, V.C., Gebhardt, B.M. y Carr, D.J.J. (1999) The inherent quantitative capacity of the reverse transcription–polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 266: 181–191.
- Harrigan, W. (1998) *Laboratory methods in Food Microbiology*. Academic Press, San Diego.
- Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. y Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
- Hernandez, P. y Beuchat, L.R. (1995) Evaluation of diluents and media for enumerating *Zygosaccharomyces rouxii* in blueberry syrup. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 11-18.
- Hicks, D. (1990) Non-carbonated fruit-containing beverages. En: “Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages”. Ed: D., Hicks. Blackie, Glasgow and London. pp: 264-306.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 11:1026-1030.
- Ho, J. H. y Johnson, A. W. (1999) *NMD3* encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2389-2399.
- Hocking, A.D. y Pitt, J.I. (1980) Dichloran-glicerol medium for for enumeration if xerophilic fungi low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 488-492.
- Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimins, K., Brown, A.J.P. y 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: 3158-3164.
- Howell, K.S., Bartowsky, E.J., Fleet, G.H. y Henschke, P.A. (2004) Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 315-320.
- Ibeas, J., Lozano, J., Perdignes, F. y Jimenez, J. (1996) Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 998-1003.
- Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. y Komatsu, Y. (1995) The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Biol.* 41: 763-769.

- James, S.A. y Stratford, M. (2003) Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. En "Yeasts in Food, beneficial and detrimental aspects". Ed: T., Boekhout. Behr's Verlag, Hamburg. pp: 171-186.
- James, S.A., Collins, M.D. y Roberts, I.N. (1996) Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 189-194.
- James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N. y Collins, M.D. (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 453-460.
- Jermeni, M.F.G. y Schmidt- Lorentz, W. (1987a) Growth of osmotolerant yeast at different water activity values. J. Food Prot. 50: 404-440.
- Jermeni, M.F.G., Geigen, O. y Schmidt-Lorenz, W. (1987) Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. J. Food Prot. 50: 468-472.
- Jespersen, L. (2003) Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. FEMS Yeast Res. 3: 191-200.
- Jespersen, L. y Jakobsen, M. (1994) Use of flow cytometry for rapid estimation of intracellular events in brewing yeasts. J. Inst. Brew. 100: 399-403.
- Jespersen, L., Lassen, S. y Jakobsen, M. (1993) Flow cytometric detection of wild yeast in lager breweries. Int. J. Food Microbiol. 17: 321-328.
- Jespersen, L., van der Kuhle, A. y Petersen, K.M. (2000) Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. Int. J. Food Microbiol. 60: 43-53.
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S. y Jakobsen, M. (2005) Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. FEMS Yeast Res. 5: 441-453.
- Kalathenos, P. y Russell, N.J. (2003) Ethanol as a food preservative. En: "Food preservatives". Ed: N.J., Russell y G.W., Gould. 2nd edn, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York Boston Dordrecht London Moscow. pp: 196-217.
- Kan, V.L. (1993) Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. J. Infec. Dis. 168: 779-783.
- Keer, J.T. y Birch, L. (2003) Molecular methods for the assessment of bacterial viability. J. Microbiol. Methods. 53: 175-183.

Bibliografía

- Keogh, R.S., Seoighe, C. y Wolfe, K.H. (1998) Evolution of gene order and chromosomal number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast*. 14: 443-457.
- Kisko, G., Sharp, R. y Roller, S. (2005) Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Appl. Microbiol.* 98: 872-880.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubs, M., Sols, A. y Bedoya, F. (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* 214: 657-663.
- Kreger-van Rij, N.J.W. (1984) *The yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd edn, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp: 1082.
- Kurtzman, C.P. (1990) DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeast*. 6: 213-219.
- Kurtzman, C.P. (1992) DNA relatedness among phenotypically similar species of *Pichia*. *Mycology* 84: 72-76.
- Kurtzman, C.P. (1998) *Zygosaccharomyces* Barker. En: "The yeasts, a taxonomic study". Ed: C.P., Kurtzman y J.W., Fell. 4th edn, Elsevier, Amsterdam. pp: 424-432.
- Kurtzman, C.P. (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspora*. *FEMS Yeast Res.* 4: 233-245.
- Kurtzman, C.P. y de Hoog, G.S. (1993) New directions in the systematics of yeasts and yeast-like fungi. *Antonie van Leeuwenhoek.* 63: 93-93.
- Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. (1998) *The yeasts, a taxonomic study* 4th edn, Elsevier Science, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. y Phaff, H.J. (1987) Molecular taxonomy. En: "The yeast". Ed: A.H., Rose y J.S., Harrison. Vol. 1. Academic Press, London. pp: 63-94.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (1991) Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast* 7: 61-72.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (1997) Identification of clinically important *Ascomycetous* yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1216-1223.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73: 331-371.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the "Saccharomyces complex" determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3: 417-432.

- Lachaise, D. (1977) Niche separation of African Lissocephala within the Ficus drosophilid community. *Oecologia* (Berlin) 31: 201-214.
- Lachance, M.A., Gilbert, D.G., Starmer, W.T. (1995) Yeast communities associated with *Drosophila* species and related flies in an eastern oak-pine forest: a comparison with western communities. *J. Ind. Microbiol.* 14: 484-494.
- Lachance, M.A., Starmer, W.T., Rosa, C.A., Bowles, J.M., Barker, J.S. y Janzen, D.H. (2001) Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res.* 1: 1-8.
- Lages, F., Silva-Graca, M. y Lucas, C. (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* 145: 2577-2585.
- Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M. y Hood, L. (1989) Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. *J. Inst. Brew.* 91: 169-173.
- Laidlaw, L., Tompkins, T.A., Savard, L. y Dowhanick, T.M. (1996) Identification and differentiation of brewing yeasts using specific and RAPD polymerase chain reaction. *J. Am. Brew. Chem.* 54 : 97-102.
- Las Heras-Vazquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M. y Rodriguez-Vico, F. (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.* 3: 3-9.
- Laureano, P., D'Antuono, I., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2003) Effect of different sanitation treatments on the numbers of total microorganisms and of *Dekkera bruxellensis* recovered from the wood of wine aging barriques. Abstracts of the 23rd International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest.
- Lawrence, D.R. (1988) Spoilage organisms in beer. En: "Developments in Food Microbiology". Ed: R.K., Robinson. Vol. 3, Elsevier, London. pp: 1-48.
- Legan, J.D. y Voysey, P.A. (1991) Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 361-371.
- Legras, J.L. y Karst, F. (2003) Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 249-255.
- Legras, J.L., Ruh, O., Merdinoglu, D. y Karst, F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 73-83.

Bibliografía

- Leitao, M.C., Teixeira, H.C., Barreto Crespo, M.T, y San Romao, M.V. (2000) Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. J. Agric. Food Chem. 48: 2780-2784.
- Li, W.H. (1997) Molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Lieckfieldt, E., Meyer, W. y Borner, T. (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. J. Basic. Microbiol. 33: 413-426.
- Loeffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagemeyer, L., Schumacher, U. y Einsele, H. (2000) Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. J. Clin. Microbiol. 38: 586-590.
- Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A. y Caballero, A.C. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. J. Appl. Microbiol. 93: 608-615.
- López, V., Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Ramón, D. y Querol, A. (2002) A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. Int. J. Food Microbiol. 81: 63–71.
- Loureiro, V. y Querol, A. (1999) The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. Trends Food Sci. Technol. 10: 356-365.
- Loureiro, V. y Malfeito-Ferreira, M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86: 23-50.
- Mackay, I.M., Arden, K.E. y Nitsche, A. (2002) Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 30: 1292-1305.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S. y Dellaglio, F. (2001) Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. J. Microbiol. Methods. 45: 127-134.
- Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M. y Loureiro, V. (1997) Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. Int. J. Food Microbiol. 38: 143-155.
- Manzano, M., Cocolin, L., Iacumin, L., Cantoni, C. y Comi, G. (2005) A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int. J. Food Microbiol. 101: 333-339.
- Marcellino, N., Beuvier, E., Grappin, R., Gueguen, M. y Benson, D.R. (2001) Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4752-4759.
- Marechal, P.A., Martinez De Maranon, I., Poirier, I. y Gervais, P. (1999) The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. Trends Food Sci. Technol. 10: 15-20.

- Margesin, R., Zache, G., Schinner, F. (2002) Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 34: 88-93.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M. y Spencer- Martins, I. (1992) Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 279-283.
- Martin, A., Cordoba, J.J., Benito, M.J., Aranda, E. y Asensio, M.A. (2003) Effect of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* on the volatile compounds during controlled ripening of pork loins. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 327-338.
- Martin, A., Cordoba, J.J., Nunez, F., Benito, M.J. y Asensio, M.A. (2004) Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 55-66.
- Martinez de Marañon, I., Marechal, P.A. y Gervaise, P. (1996) Passive response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shifts: cell volume variations depending on the physiological state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227: 519-523.
- Martinez, C., Gac, S., Lavin, A. y Ganga, M. (2004) Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1161-1168.
- Martorell, P., Fernandez-Espinar, M.T. y Querol A. (2005a) Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*. *FEMS Yeast Res.* 5: 1157-1165.
- Martorell, P., Fernandez-Espinar, M.T. y Querol, A. (2005b) Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *Int. J. Food Microbiol.* 101: 293-302.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V. y Querol, A. (2005c). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *Int. J. Food. Microbiol.* 14.
- Martorell, P. Querol, A. y Fernández-Espinar, M.T. (2005d) Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* species directly from wine by Real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6823-6830.
- Masneuf, I., Aigle, M. y Dubordieu, D. (1996) Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 239-244.
- Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L. y Jakobsen, M. (2004) Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast.* 21: 549-556.

Bibliografía

- Meroth, C.B., Hammes, W.P. y Hertel, C. (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7453-7461.
- Metaxopoulos, J., Stavropoulos, S., Kakouri, A. y Samelis, J. (1996) Yeasts isolated from traditional greek dry salami. *J. Food Sci.* 1: 25-32.
- Middelhoven, W.J. y Notermans, S. (1993) Immuno-assay techniques for detecting yeasts in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 53-62.
- Millet, V. y Lonvaud-Funel, A. (2000) The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 136-141.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A. y Cocolin, L. (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4884-4893.
- Mitrakul, C., Henick-Kling, T. y Egli, C. (1999) Discrimination of *Dekkera/Brettanomyces* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiol.* 16: 3-14.
- Moleyar, V. y Narasimham, P. (1992) Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 337-342.
- Molnar, O., Messner, R., Prillinger, H., Stahl, U. y Slavikova, E. (1995) Genotypic identification of *Saccharomyces* species using random amplified polymorphic DNA analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 136-145.
- Moreira da Silva, M., Malfeito-Ferreira, M., Aubyn, S. y Loureiro, V. (1994) Long chain fatty acid composition as criterion for yeast distinction in the brewing industry. *J. Inst. Brew.* 100: 17-22.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A. y Dobson, A.D. (2004) The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 97: 647-655.
- Murphy, A. y Kavanagh, K. (1999) Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen implications for biotechnology. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 551-557.
- Muyzer, G. y Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. y Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nakase, T. y Suzuki M. (1985) Ballistospore forming yeasts found on the surface Japanese rice plant, *Oryza sativa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31: 457-474.

- Nakase, T., Suzuki, M., Phaff, H.J. y Kurtzman, C.P. (1998) *Debaryomyces* Lodder and Kreger-van Rij Nom. Cons. En: "The yeasts, a taxonomic study". Ed: C.P., Kurtzman y J.W., Fell. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp: 157-173.
- Naumov, G.I., Masneuf, I., Naumova, E.S., Aigle, M. y Dubourdieu, D. (2000) Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. Res. Microbiol. 151: 683-691.
- Naumov, G.I., Nguyen, H.V., Naumova, E.S., Michel, A., Aigle, M. y Gaillardin, C. (2001) Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. Int. J. Food Microbiol. 65: 163-171.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Antunovics, Z. y Sipiczki, M. (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 727-730.
- Naumova, E.S., Korshunova, I.V., Jespersen, L. y Naumov, G.I. (2003) Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. FEMS Yeast Res. 3: 177-184.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubordieu, D., Aigle, M. y Dulau, L. (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. J. Sci. Food Agric. 62: 89-94.
- Nguyen, H.V. y Gaillardin, C.A. (1997) Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the Non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. Syst. Appl. Microbiol. 20: 286-294.
- Nielsen, D.S., Honholt, S., Tano-Debrah, K. y Jespersen, L. (2005) Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Yeast. 22: 271-284.
- Nishikawa, A., Sugita, T. y Shinoda, T. (1997) Differentiation between *Debaryomyces hansenii/Candida famata* complex and *Candida guilliermondii* by polymerase chain reaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 19: 125-129.
- Nishikawa, A., Sugita, T. y Shinoda, T. (1999) Rapid identification of *Debaryomyces hansenii/Candida famata* by polymerase chain reaction. Med. Micol. 37: 101-104.
- Odds, F.C. y Bernaerts, R. (1994) CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32: 1923-1929.
- Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y. y Delacroix-Buchet, A. (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems

Bibliografía

- by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5628-5643.
- Oliveira, K., Haase, G., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J. y Stender, H. (2001) Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. J. Clin. Microbiol. 39: 4138-4141.
- Paffetti, C., Barberi6, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Fani, R., Fia, G., Mori, E. y Polsinelli, M. (1995) DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing. Res. Microbiol. 146: 587-594.
- Parish, M.E. y Carroll, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. Am. J. Enol. Vitic. 36: 165-169.
- Petersen, K.M., Westall, S. y Jespersen, L. (2002) Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaces-ripened cheeses. J. Dairy Sci. 85: 478-486.
- Petersen, K.M. y Jespersen, L. (2004) Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface-ripened cheeses. J. Appl. Microbiol. 97: 205-213.
- Petters, H. I., Flannigan, B. y Austin, B. (1988) Quantitative and qualitative studies of microflora of barley malt production. J. Appl. Bacteriol. 65: 279-297.
- Phaff, H.J., Miller, M.W. y Mrak, E.M. (1978) The life of yeasts. 2nd edn, Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Phister, T.G., y Mills, D.A. (2003) Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7430-7434.
- Pina, C., Teixeira, P., Leite, P., Villa, M., Belloch, C. y Brito, L. (2005) PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain. J. Appl. Microbiol. 98: 1107-1114.
- Piper, P., Ortiz Calderon, C., Hatzixanthis, K. y Mollapur, M. (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. Microbiology. 147: 2635-2642.
- Pitt, J.I. y Hocking, A. D. (1985) Fungi and Food Spoilage. Academic Press.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1988) Fungi and Food spoilage. Academic Press , Sydney. pp.413.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997) Fungi and food spoilage, 2nd edn, Blackie Academic and Professional, London Weinhein New York Tokyo Melbourne Madras.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1998). Problems with preservative resistant yeasts. Microbiologie-Aliments-Nutrition 6: 19-24.

- Posada, D. y Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Prakitchaiwattana, C., Fleet, G.H. y Heard, G.M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4: 865-877.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. y Typas, M.A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strains level a case study with strains from two vine-growing areas of Grece. *J. Appl. Microbiol.* 89: 236-248.
- Price, C.W., Fuson, G.B. y Phaff, H.J. (1978) Genome comparison in yeast systematic: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* 42: 161-193.
- Prillinger, H., Molnar, O., Eliskases-Lechner, F. y Lopandic, K. (1999) Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 75: 267-283.
- Prista, C., Loureiro-Dias M.C., Montiel, V., Garcia, R. y Ramos, J. (2005) Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 5:693-701.
- Pryce, T.M., Kay, I.D., Palladino, S. y Heath, C.H. (2003) Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 487-496.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. y Perez-Ortin, J.E. (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2057-2061.
- Pulvirenti, A., Nguyen, H., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S. y Zambonelli, C. (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* 192: 191-196.
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De vero, L. y Giudici, P. (2004) Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:113-117.
- Querol, A. y Barrio, E. 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 18: 1657.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992a) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D. (1992b) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.

Bibliografía

- Quesada, M.P. y Cenis, J.L. (1995) Use of random amplified polymorphic DNA RAPD-PCR in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 204-208.
- Quiros, M., Wrent, P., Valderrama, M.J., de Siloniz, M.I. y Peinado, J.M. (2005) A beta-glucuronidase-based agar medium for the differential detection of the yeast *Debaryomyces hansenii* from foods. *J. Food Prot.* 68: 808-814.
- Quiros, M., Martorell, P., Valderrama, M.J., Querol, A., Peinado, J.M., de Silóniz, M.I. PCR-RFLP of the IGS region of DNA: a useful tool for the practical discrimination between the species of the genus *Debaryomyces*. Enviado.
- Rådström, P., Löfström, C., Lövenklev, M., Knutsson, R. y Wolfss, P. (2003) Strategies for overcoming PCR inhibition. En: "PCR Primer. A laboratory manual". Ed: C.W., Dieffenbach y G.S., Dveksler. 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. pp: 149-161.
- Ramos, J.P., Valente, P., Hagler, A.N. y Leoncini, O. (1998) Restriction analysis of ITS region for characterization of the *Debaryomyces* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 399-404.
- Rankine, B.C. y Pilone, D.A. (1974) Yeast spoilage of bottled table wine and its prevention. *Aust Wine Brew. Spirit. Rev.* 9211: 36-40.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G. y Cocolin, L. (2005) Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1977-1986.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Sikora, S., Majdak, A. y Pretorius, I.S. (2002) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 305-310.
- Rigby, S., Procop, G.W., Haase, G., Wilson, D., Hall, G., Kurtzman, C., Oliveira, K., Von Oy, S., Hyldig-Nielsen, J.J., Coull, J. y Stender, H. (2002) Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2182-2186.
- Rodrigues, U.M. y Kroll, R.G. (1986) Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 139-144.
- Rodrigues, F., Corte-Real, M., Leao, C., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2001a) Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2123-2128.
- Rodrigues, N., Goncalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2001b) Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 588-599.

- Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., van Broock, M., Valles, S., Ramon, D. y Caballero, A.C. (2004) Screening and typing of Patagonia wine yeasts for glycosidase activity. *J. Appl. Microbiol.* 96: 84-95.
- Romano, A., Casaregola, S., Torre, P. y Gaillardin, C. (1996) Use of RAPD and Mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 255-264.
- Romano, P., Marchese, R., Laurita, C., Saleano, G. y Turbanti, L. (1999) Biotechnological suitability of *Saccharomyces ludwigii* for fermented beverages. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 451-454.
- Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G. y Suzzi, G. (2001) Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 45-51.
- Romero, P., Patiño, B., Quirós, M., González-Jaén, M.T., Valderrama, M.J., Silóniz, M.I. y Peinado, J.M. (2005) Differential detection of *Debaryomyces hansenii* isolated from intermediate-moisture foods by PCR-RFLP of the IGS region of rDNA. *FEMS Yeast Res.* 5: 455-461.
- Sadler, G.D., Parish, M.E. y Wicker, L. (1992) Microbial, enzymatic and chemical changes during storage of fresh and processed orange juice. *J. Food Sci.* 57: 1187-1191, 1197.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schaf, S.J., Higuchi, R., Hopyn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sancho, E.D., Hernandez, E. y Rodriguez-Navarro, A. (1986) Presumed sexual isolation in yeast populations during production of sherrylike wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 395-397.
- Sand, F.E.M.J. (1973) Recent investigations on the microbiology of fruit juice concentrates. En: *Technology of fruit juice concentrates, chemical composition of fruit juices*. Ed: Scientific-Technical Commission XIII, International Federation of Fruit Juice Producers, Wein. pp:185-216.
- Sand, F.E.M.J. (1974) An ecological survey of yeasts within a soft drinks plant. *Proc. Int. Symp. Yeasts*, 4th, Hochsch. Bodenkult., Vienna Part 1. pp: 263-264.

Bibliografía

- Scheda, R. y Yarrow, D. (1966) The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeast. *Arch. Microbiol.* 55: 209-225.
- Scheda, R. y Yarrow, D. (1968) Variations in the fermentative pattern of some *Saccharomyces* species. *Arch. Microbiol.* 61: 310-316.
- Schmidt, H.J. (1995) Modern microbiology in soft drinks operations. *Brauwelt Int.* 13: 220-222.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J. y Reed, M.W. (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 285: 194-204.
- Schuller, D., Corte-Real, M. y Leao, C. (2000) A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in wine. *J. Food Prot.* 63: 1570-1575.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. y Casal, M (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231: 19-26.
- Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A. y Statzell-Tallman, A. (2002) Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.* 2: 495-517.
- Selvarangan, R., Bui, U., Limaye, A.P. y Cookson, B.T. (2003) Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5660-5664.
- Sheridan, G.E.C., Masters, C.I., Shallcross, J.A. y Mackey, B.M. (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1313-1318.
- Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. (1986) En "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbord Laboratory. Cod Spring Harbor, NY.
- Smole-Mozina, S., Dlačny, D., Deak, T. y Raspor, P. (1997) Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulopsis* yeasts by PCR ribotyping. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 311-315.
- Spencer, D.M., Spencer, J.F.T., de Figueroa, L. y Heluane, H. (1992). Yeasts associated with rotting citrus fruits in Tucuman, Argentina. *Mycol. Res.* 96: 891-892.
- Spoering, A.L. y Lewis, K. (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183: 6746-6751.
- Sponholz, W.F. (1992) Wine spoilage by microorganisms. En: "Wine microbiology and Biotechnology". Ed: G.H., Fleet. Harwood Academic Publishers. pp: 395-419.

- Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N. y Stratford, M. (1999) *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature. *J. Appl. Microbiol.* 87: 520-527.
- Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N. y Stratford, M. (2000) Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast.* 16: 1173-1183.
- Steels, H., James, S.A., Bond, C.J., Roberts, I.N. y Stratford, M. (2002) *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Res.* 2: 113-121.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B. y Coull, J. (2001) Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 938-941.
- Stopforth, J.D., Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A. y Smith, G.C. (2002) Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *J. Food Protection.* 65: 1717-1727.
- Stratford, M. (1992) Yeast flocculation: a new perspective. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 1-72.
- Stratford, M. (2005) Food and beverage spoilage yeasts. En: "The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages". Ed: A., Querol, y G., Fleet. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany. En prensa.
- Stratford, M. y Eklund, T. (2003) Organic acids and esters. En: "Food preservatives". Ed: N.J., Russell y G.W., Gould. 2nd edn, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York Boston Dordrecht London Moscow. pp: 48-84.
- Stratford, M. y James, S.A. (2003) Non-alcoholic beverages and yeasts. En: "Yeasts in food. Beneficial and detrimental aspects". Ed: T., Boekhout, y V., Robert. Behr's Verlag, Hamburg. pp: 309-346.
- Stratford, M., Hofman, P.D. y Cole, M.B. (2000) Fruit juices, fruit drinks and soft drinks. En: "The microbiological safety and quality of food". Ed: B.M., Lund, A.C., Baird-Parker, y G.W., Gould. Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, Maryland. pp: 836-869.
- Stratford, M., Bond, C.J., James, S.A., Roberts, N. y Steels, H. (2002) *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft-drinks spoilage yeast isolated from a wasp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1369-1375.
- Stubbs, S., Hutson, R., James, S. y Collins, M.D. (1994) Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* from other *Zygosaccharomyces* species using 18S

Bibliografía

- rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 268-272.
- Su, C.S. y Meyer, S. A. (1991) Characterization of mitochondrial DNA in various *Candida* species. Isolation, restriction endonuclease analysis, size and base composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 6-14.
- Suzzi, G., Romano, P. y Benevelli, M. (1992) The flocculation of wine yeasts: biochemical and morphological characteristics in *Zygosaccharomyces* - flocculation in *Zygosaccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 61: 317-322.
- Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M.T., Caruso, M., Andrighetto, C. y Gardini, F. (2000) Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* 88: 117-123.
- Suzzi, M., Reale, A., Andrighetto, C., Lombardi, A., Sorrentino, E. y Coppola, R. (2003) Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiol. Lett.* 225: 143-148.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Taniwaki, M.H., Silva, N., Banhe, A.A. y Iamanaka, B.T. (2001) Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *J. Food Prot.* 64: 1592-1596.
- Taylor, R.B. (1998) Ingredients. En: "The chemistry and technology of soft drinks and fruit juices". Ed: P.R., Ashurst. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK and CRC Press, Boca Raton. pp: 16-54.
- Tchango Tchango, J., Tailliez, R., Eb, P., Njine, T. y Hornez, J.P. (1997) Heat resistance of the spoilage yeasts *Candida pelliculosa* and *Kloekera apis* and pasteurization values for some tropical fruit juices and nectars. *Food Microbiol.* 14: 93-99.
- Theelen, B., Silvestri, M., Gueho, E., van Belkum, A. y Boekhout, T. (2001) Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.* 1: 79-86.
- Thomas, D.S. (1993) Yeasts as spoilage organisms in beverages. En: "The yeasts, Vol. 5: Yeast Technology". Ed: A.H., Rose, y J.S., Harrison. 2nd edn, Academic Press, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto. pp: 517-562.
- Thomas, D.S. y Ackerman, J.C. (1988) A selective medium for detecting yeasts capable of spoiling wine. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 299-308.
- Thomas, D.S. y Davenport, R.R. (1985) *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol* 2: 157-169.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acid. Res.* 22: 4673-4680.
- Tilbury, R.H. (1980a) Xerotolerant yeasts at high sugar concentrations. En: "Microbial growth and survival in extremes of environment". Ed: G.W., Gould y J.E.L., Corry. Society for Applied Bacteriology Technical Series 15, Academic Press, London New York Toronto Sydney San Francisco. pp: 103-128.
- Tilbury, R.H. (1980b) Xerotolerant (osmophilic) yeasts. En: "Biology and activity of yeasts". Ed: F.A., Skinner, S.M., Passmore y R.R., Davenport. Society for Applied Bacteriology, Symposium Series, Academic Press, London New York Toronto Sydney San Francisco. pp: 153-179.
- Tokuoka, K. (1993) A review. Sugar- and salt-tolerant yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 101-110.
- Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S. y Komagata, K. (1985) Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31: 411-427.
- Tominaga, T. (2004) Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 43-48.
- Tornai-Lehoczki, J. y Dlauchy, D. (2000) Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 562: 37-45.
- Tornai-Lehoczki, J., Peter, G. y Dlauchy, D. (2003) CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 189-200.
- Török, T., Rockhold, D. y King, A.D. (1993) Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridisation in yeast identification. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 63-80.
- Trama, J.P., Mordechai, E. y Adelson, M.E. (2005) Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. Cell. Probes.* 19: 145-152.
- Tredoux, H.G., Kock, J.L.F., Lategan, P.M. y Muller, H.B. (1987) A rapid identification technique to differentiate between *S. cerevisiae* strains and other yeast species in the winery industry. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 161-164.
- Trilles, L., Lazera, M., Wanke, B., Theelen, B. y Boekhout, T. (2003) Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med. Mycol.* 41: 383-390.
- Tseng, S.Y., Macool, D., Elliott, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M., Amorese, D. (1997) An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*. *Anal Biochem.* 245:207-212.

Bibliografía

- Tudor, E.A. y Board, R.G. (1993) Food-spoilage yeasts. En: "The yeasts, Vol. 5: Yeast Technology". Ed: A.H., Rose y J.S., Harrison. 2nd edn, Academic Press, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto. pp: 435-516.
- Vacanneyt, B.P., Hennebert, G. y Kersters, K. (1991) Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 23-32.
- Valderrama, M.J., de Siloniz, M.I., Gonzalo, P. y Peinado, J.M. (1999) A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products. *J. Food Prot.* 62: 189-193.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M. y Dequin, S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5: 959-969.
- van der Aa Kuhle, A. y Jespersen, L. (1998) Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 205-213.
- van der Aa Kuhle, A., Jespersen, L., Glover, R.L., Diawara, B. y Jakobsen, M. (2001) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from west African sorghum beer. *Yeast.* 18: 1069-1079.
- van der Vossen, J.M. y Hofstra, H. (1996) DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 35-49.
- van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E. y Gerlosky, W. (2003) Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 83: 149-154.
- van Vuuren, H.J. y Van Der Meer, L. (1987) Fingerprinting of yeast by protein electrophoresis. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 49-53.
- Vasdinyei, R. y Deak, T. (2003) Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 123-130.
- Veal, D.A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. y Attfield, P.V. (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods.* 243: 191-210.
- Vezinhet, F., Blondin, B. y Hallet, J.N. (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 568-571.
- Vos, P., Hogers, R. y Bleeker, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

- Watanabe, Y., Miwa, S. y Tamai, Y. (1995) Characterization of the Na⁺ antiporter gene closely related to the salt-tolerance gene of yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast*. 11: 829-838.
- Watson, K. (1987) Temperature relations. En: "The yeast, Vol. 2: Yeast and Environment". Ed: A.H., Rose y J.S., Harrison. Academic Press Limited, London. pp: 41-71.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, E. y Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: "PCR protocols: a guide to methods and applications". Ed: M.A., Innis, D.H., Gelfand, J.J., Sninsky, T.J., White. Academic Press, San Diego. pp: 315-322.
- White, P.L., Shetty, A. y Barnes, R.A. (2003) Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J. Med. Microbiol.* 52: 229-238.
- Wilhelm, J. y Pingoud, A. (2003) Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Review Chem. Bio. Chem.* 4: 1120-1128.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990) DNA-polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* 387: 708-713.
- Yamada, Y., Nagahama, T. y Banno, I. (1991) The molecular phylogeny of the Q₉-equipped ascomycetous teleomorphic yeast genus *Debaryomyces* Lodder et Kreger-Van Rij based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37: 277-288.
- Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K. y Totsuka, A. (1991) Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 358-363.

Resumen

La importancia de las levaduras se conoce desde hace mucho tiempo y con el desarrollo de la industria, se utilizan no sólo para la elaboración de un gran número de productos fermentados (cerveza, vino, quesos y embutidos), sino también para la producción de antibióticos, vitaminas, enzimas, etc. Sin embargo, las levaduras tienen también un aspecto negativo, debido a su potencial como alterantes de alimentos, lo que implica pérdidas económicas importantes para las industrias. En el presente trabajo se abordan aspectos relacionados con la identificación y caracterización molecular de algunas de las especies típicamente alterantes, pertenecientes a los géneros *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera*, *Pichia* y *Saccharomyces*. El objetivo es proporcionar a las industrias sistemas nuevos de identificación rápida de levaduras así como mostrar, con ejemplos concretos, la utilidad de la aplicación de las técnicas moleculares para resolver problemas a nivel industrial. Así, se ha determinado que la comparación de secuencias de la región ribosómica 5,8S-ITS y del gen de la actina resulta el método más óptimo para identificar de forma rápida y precisa las especies del género *Debaryomyces*, que están implicadas en la alteración de alimentos procesados. Además, el presente trabajo muestra cómo la aplicación de técnicas moleculares es de gran utilidad para determinar las levaduras alterantes a lo largo de la cadena de producción alimentaria. En el presente trabajo, se muestran dos ejemplos de contaminación en la industria, en concreto en la producción de turrón de frutas confitadas y en la elaboración de vino. Se identificó mediante la técnica de RFLPs del mtDNA y RAPD-PCR, la especie *Zygosaccharomyces baillii* fue la levadura responsable de la alteración de dichos turrones, siendo los jarabes usados para macerar las frutas el origen de contaminación en la cadena de producción. Además, la caracterización fisiológica de dichas cepas, permitió evidenciar el potencial alterante de estas levaduras, ya que presentan una elevada resistencia a conservantes alimentarios, adaptación a bajo pH y baja a_w . Por otro lado, la utilización de medios selectivos, como el DBDM, así como la técnica de análisis de restricción de la región 5,8S-ITS, permitieron identificar las especies *Dekkera bruxellensis* y *Pichia guilliermondii* como las levaduras alterantes más peligrosas en el vino, por su gran capacidad para producir elevados niveles de 4-etilfenol, responsables de olores desagradables en el vino. Mediante las técnicas de RFLPs mtDNA con *Hinfl* y RAPD-PCR se determinó que el origen de contaminación de *D. bruxellensis* se produce antes del envejecimiento en bodega, y que las levaduras de la especie *P. guilliermondii* están presentes en las uvas y raspones, por lo que proceden del exterior de la bodega. Finalmente, y dado que la determinación del número de levaduras resulta esencial para los programas de conservación de alimentos, se consideró de gran interés desarrollar

Resumen

una técnica que permitiera la identificación y simultánea cuantificación de levaduras directamente en el alimento. En el presente trabajo, se ha desarrollado un protocolo de PCR a tiempo real específico para *S. cerevisiae* utilizando SYBR-Green como agente fluorescente. Dicha técnica resultó ser muy sensible, permitiendo la detección de 3-5 UFC/mL en vino. El sistema de PCR a tiempo real desarrollado es también útil para cuantificar de forma precisa el número de células de *S. cerevisiae* presentes en el vino, permitiendo de esta manera estimar el riesgo de alteración del vino durante su almacenamiento y distribución. Además, el sistema se puede extender a otros alimentos y bebidas donde *S. cerevisiae* puede causar alteración.