

“Las levaduras en los alimentos: ¿buenas amigas, peores enemigas?”

J. M. Peinado, M.I de Silóniz, P. Wrent, E.M. Rivas, E. Gil de Prado, O. Esteban y J. F. Vera. Dpto. Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.

Oportunidades que las nuevas tecnologías en la producción de alimentos ofrecen a las levaduras (y a los zimólogos que las estudian).

Está generalmente aceptado que uno de los pilares fundacionales de la Microbiología como ciencia moderna fueron los estudios de Pasteur sobre la producción y deterioro de la cerveza. La producción de alimentos había sido hasta entonces un proceso puramente empírico, basado en la consolidación de los aciertos y rechazo de los errores, que había dado lugar a unas reglas de fabricación ancestrales cuyo estricto cumplimiento aseguraba, aunque no siempre, el éxito final. Fue mérito, en este caso de los industriales cerveceros, no de los científicos, el que se les ocurriera que la ciencia podía ayudar a disminuir los fracasos. Pasteur, al mismo tiempo que mostró que el análisis de un problema industrial puede llevar a resolver polémicas científicas tan trascendentales como la generación espontánea, demostrando que Francesco Redi tenía razón y “Omne vivum ex vivo”, sentó las bases metodológicas para el análisis del deterioro de los alimentos asociándolo al proceso de fabricación. Como consecuencia empezó a quedar claro desde entonces, y seguimos confirmándolo día a día, que los microorganismos solo hacen lo que han aprendido a hacer a lo largo de su evolución, desarrollando sus actividades metabólicas según las condiciones del ambiente en que se encuentran. La fermentación alcohólica de *Saccharomyces*, que es esencial para la fabricación de vino y cerveza, es negativa cuando ocurre en los yogures. La fermentación de las bacterias lácticas, esencial para la producción de yogur, es negativa si ocurre en vinos y cervezas. Una consecuencia importante de este análisis es que la ciencia microbiológica que hay que desarrollar y aplicar a los procesos industriales microbianos, sea producción o deterioro, es exactamente la misma: la ecofisiología microbiana. Con Pasteur, un nuevo campo de investigación con una orientación claramente aplicada, se había abierto: El descubrimiento y caracterización de los microorganismos responsables por las transformaciones, positivas o negativas, que ocurrían en procesos desarrollados artesanalmente.

El primer empresario en montar su propio laboratorio de I+D fue Jacob Christian Jacobsen (1811 –1887), fundador de la Carlsberg Brewery en 1847, y del Carlsberg Laboratory en 1875. Fue pionero y modelo paradigmático de empresario que cree en la ciencia. Siguiendo la estela de Pasteur, el laboratorio inició con Hansen, creador la primera colección de microorganismos, la práctica industrial de los cultivos iniciadores y al mismo tiempo en él se desarrollaron conceptos científicos universales como el de pH, descrito por el Dr.Sørensen en 1909. Sin embargo las dificultades de aplicar el método científico a un proceso artesanal, debidas a las características esenciales de cada abordaje, pronto se hicieron notar. El método empírico había producido procesos

basados en una red muy compleja de interrelaciones entre los diferentes factores intervinientes, que el abordaje reduccionista propio de la ciencia era incapaz de abarcar en algunos casos. Como consecuencia, en los casos de redes más complejas, la aplicación directa de un resultado científico podía romper el equilibrio alcanzado empíricamente y el proceso se alteraba negativamente. Para superar esas dificultades es necesario cerrar el círculo artesanía-empirismo-ciencia con otra rama que incluye el análisis de los problemas planteados por la aplicación del resultado científico para que la tecnología los resuelva, de manera que se vuelva a producir un alimento con la calidad del artesano pero con las ventajas introducidas por la tecnología.

La relevancia del análisis científico de las alteraciones producidas por los cambios tecnológicos en la fabricación de alimentos fue reconocida de manera explícita, en la década de los 90, con varios proyectos europeos financiados con ese objetivo. El envasado en atmósferas modificadas, las nuevas formulaciones de los alimentos, la ausencia de conservantes en los productos orgánicos, el control biológico de plagas en la agricultura y los nuevos cultivos iniciadores, son ejemplos de las nuevas oportunidades que las novedades tecnológicas ofrecen para su estudio por los microbiólogos de alimentos. En nuestro laboratorio hemos investigado algunos de ellos, especialmente los protagonizados por levaduras.

Deterioro por producción de CO₂ fermentativo.

Las levaduras, y especialmente las especies pertenecientes a la familia *Saccharomycetaceae*, son las mayores productoras de gas entre los microorganismos. Ello se debe a varias características: todas tienen una gran capacidad de transporte de azúcares y producción de piruvato y poseen alcohol deshidrogenasa que cataliza la formación de etanol y CO₂, pero se diferencian en su capacidad respiratoria. *S. cerevisiae* reprime la síntesis de citocromos en presencia de concentraciones altas de glucosa, por lo que en esas condiciones toda la glucosa es fermentada. *Zygosaccharomyces* y *Torulaspora* no reprimen los citocromos pero tienen una capacidad respiratoria pequeña y la fermentación ocurre cuando el flujo glicolítico es mayor que ésta (2). Finalmente hay un grupo muy diverso de especies, que incluye especies de los géneros *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida* y *Meyerozyma* entre otros, con una capacidad respiratoria mayor, que es capaz de absorber todo el flujo glicolítico y por tanto solo fermentan en ausencia de oxígeno. Curiosamente en nuestro laboratorio apenas una vez hemos encontrado a *S. cerevisiae* como agente etiológico de alimentos alterados por hinchamiento y en el resto de los casos se trataba de especies pertenecientes a los otros dos grupos.

El envasado de alimentos en atmósferas modificadas con plásticos impermeables a los gases puede poner de manifiesto fermentaciones que sin envasado pasarían desapercibidas (Fig.1). Ese fue el caso de unos higos envasados al vacío en el que identificamos como levadura responsable del hinchamiento a una cepa de *Zygosaccharomyces bailii*. Para hacer estudios de trazabilidad diseñamos un método de

tipado basado en el análisis RFLP de la región IGS del rADN que no solo permitió localizar el origen de la contaminación sino que puso de manifiesto alguna de las dificultades ligadas a estas técnicas, como la incorrecta identificación de cepas en las colecciones de cultivos y la presencia de híbridos (11).



Fig. 1



Fig.2

Más interesante y complejo resultó el caso de los yogures orgánicos contaminados con levaduras (Fig.2). En este problema se reunían inicialmente dos modificaciones al proceso tradicional: cambio en la formulación clásica por la adición de mermelada y la ausencia de conservantes por ser producto “orgánico”. Además la mermelada era de fresas de cultivo orgánico, por lo que podían haber sido inoculadas en el campo con microorganismos para el control biológico. Los resultados iniciales del laboratorio de control eran paradójicos porque la contaminación por levaduras era muy abundante en todos los yogures, estuvieran hinchados o no, pero no aparecía rastro de ellas en ninguno de los ingredientes. El problema consistía en la media o baja actividad de agua de las matrices analizadas. Las levaduras son contaminantes habituales de este tipo de alimentos porque muchas de las especies son osmotolerantes y resisten la muerte por apoptosis provocada por las elevadas concentraciones de azúcar (6). El empleo de la metodología adecuada para el análisis microbiológico de alimentos con media y baja actividad de agua (1,4,5) reveló la presencia de levaduras también en la mermelada. La aplicación completa de los postulados de Koch, especialmente la reproducción del efecto tras la reinoculación de la cepa aislada, permitió atribuir el hinchamiento a una levadura que fue identificada como *Meyerozyma* (antigua *Pichia*) *guilliermondii*. Los análisis de tipado, resultaron complejos porque inicialmente hubo que utilizar RFLPs de mitADN e IGS de rDNA, pero consiguieron demostrar que la cepa presente en la mermelada era la misma que estaba en los yogures (13). Actualmente hemos desarrollado otra metodología de tipado, basada en el análisis de microsátélites, más barata y eficiente (15). Pretendimos trazar el origen hasta los cultivos de fresa, pero no fuimos autorizados. Los estudios fisiológicos con la cepa responsable del deterioro nos permitieron identificar las características propias de la cepa que facilitaban su potencial deteriorante. Era una cepa capaz de crecer en lactato, incluso a partir de inóculos muy

bajos lo que explicaba su presencia en todos los tipos de yogur, pero era incapaz de fermentar lactosa, lo que explicaba que solo en los yogures con azúcares fermentables añadidos con la mermelada, hubiera producción de gas. Un aspecto novedoso lo constituyó la inhibición selectiva de la fermentación, pero no del crecimiento, a temperaturas bajas, lo que explicaba que el hinchamiento solo se detectase cuando se interrumpió la cadena de frío. Además formaba biofilms lo que facilitaba la contaminación de las máquinas en la fábrica. Es interesante considerar que todas estas características son precisamente las que se buscan en la selección de microorganismos para el control biológico en agricultura. Este no es un argumento en contra del control biológico. Simplemente indica que la inoculación de levaduras fermentativas implica un peligro cuyo riesgo hay que minimizar eliminando determinadas características en las cepas industriales.

La inyección de salmuera en diversos tipos de productos cárnicos es una práctica industrial que parece aumentar su frecuencia. Por otra parte, también se va extendiendo la inoculación de cultivos iniciadores en embutidos, además de las bacterias lácticas (BAL), para mejorar las características organolépticas. La levadura *Debaryomyces hansenii*, por sus características enzimáticas, es de las especies más recomendadas para este fin. Sin embargo la inyección de salmuera, si no está estéril, puede ser la vía de introducción de microorganismos fermentativos que creen vesículas de gas en el interior del embutido (Fig.4), así como también puede producir gas la incorporación de levaduras a la masa del embutido (Fig.3). Si la cepa puede crecer aeróbicamente utilizando el lactato producido por las BAL, se crea una simbiosis entre levaduras y bacterias porque el consumo del ácido por la levadura hace subir el pH, lo que permite a las BAL seguir creciendo y produciendo más ácido. Esta subida del pH altera la correcta compactación y maduración de los embutidos. Por otra parte, la gran población de levaduras acumulada comienza a fermentar cuando se agota el oxígeno, con la acumulación de gas. Nuestros estudios fisiológicos han demostrado que la fermentación la realizan las levaduras Crabtree - en la fase estacionaria en la que todo el azúcar consumido es fermentado, en contraste con las Crabtree + que la realizan durante el crecimiento para obtener energía.



Fig. 3



Fig.4

Para la identificación rápida de *Debaryomyces hansenii* hemos diseñado un medio diferencial (*Debaryomyces* Differential Medium, DDM) basado en la detección de la actividad enzimática β -glucuronidasa. En este medio, entre 120 especies de bacterias, levaduras y mohos ensayados, solo *Debaryomyces hansenii* produjo colonias violetas (7). El uso de este medio permitió identificar como *Candida cretensis* a unas cepas con todas las características fisiológicas de *D. hansenii*, pero que no producían colonias violeta. De esta especie solo se conocía una cepa (8). El análisis de la región IGS en *Debaryomyces hansenii* fue de gran utilidad. Analizando su tamaño descubrimos que este dato permitía distinguir entre 21 especies diferentes, contaminantes habituales de alimentos. Además el análisis RFLP permitió distinguir las distintas especies del género y también las dos variedades de la especie *Debaryomyces hansenii*, var. *hansenii* y var. *fabrii*. Estos datos apoyaban la transformación de las variedades en especies independientes, como finalmente ha ocurrido (9,10). La experiencia acumulada con *Debaryomyces* hizo que se le encargara la redacción del capítulo correspondiente a este género en la “Encyclopedia of Food Microbiology” a la Dra Siloniz (12). De nuevo hay que resaltar que estos resultados, que demuestran que *Debaryomyces hansenii* puede producir CO₂ fermentativo y por tanto es un peligro para la calidad de los alimentos fermentados, no indican que haya que renunciar a sus ventajas como productor de enzimas de interés. Sin embargo si indican que habrá que minimizar el riesgo de deterioro seleccionando cepas con baja o nula capacidad fermentativa en las condiciones de elaboración y conservación del alimento.

Malos olores: Producción de 1,3 Pentadieno por descarboxilación del sorbato

El sorbato es uno de los conservantes más ampliamente utilizados en la elaboración de alimentos. Su acción se basa en la acidificación del pH intracelular, por lo que, para que sea eficaz, el pH externo tiene que ser inferior a su pK, ya que las formas protonadas son las únicas capaces de entrar en la célula. Esos protones son los que se disocian en el citoplasma, por su pH neutro, y para mantener ese pH la célula tiene que expulsarlos a través de una bomba que gasta ATP (18,21). Es posible que el anión también tenga alguna acción tóxica y por ello algunos autores piensan que su descarboxilación por algunas especies de mohos y levaduras, transformándolo en 1,3 pentadieno que se volatiliza, constituiría un mecanismo de destoxificación. Pero ese compuesto tan volátil tiene un desagradable olor a keroseno y los alimentos con sorbato en los que esta reacción ocurre tienen que ser retirados. En nuestro laboratorio hemos analizado varios productos con este tipo de alteración, fundamentalmente en alimentos ricos en azúcar, en los que las cepas productoras pertenecían a las especies *Debaryomyces hansenii* y *Zygosaccharomyces rouxii*. Hemos encontrado que la capacidad de producción es una característica de cepa, no de la especie (16,17).

El objetivo investigador en este caso era encontrar un marcador genético específico, no de especie, sino de efecto deteriorante. Los genes implicados en la descarboxilación son al menos dos, PAD1 que codifica una enzima denominada Descarboxilasa del Ácido Fenilacrilico, y FDC1 que codifica la Descarboxilasa del Ácido Ferulico. Actualmente se cree que ambas enzimas son necesarias para la descarboxilación ya que la primera reclutaría y aportaría un cofactor (FMN) que es necesario para la acción descarboxiladora de la segunda. Nuestros resultados indican que PAD1 no sirve como marcador, porque se encuentra en todas las cepas de ambas especies, productoras o no, por lo que nos estamos concentrando en el estudio del gen FDC1. Sin embargo existe un polimorfismo en el gen PAD1 de *Debaryomyces hansenii*, en contraste con la homogeneidad que presenta en *Zygosaccharomyces rouxii*, que podría ser una herramienta más en la caracterización de esta especie.

Nuestro trabajo se ha extendido también al diseño de pruebas rápidas para la detección temprana de los productos que finalmente causan el deterioro. El desarrollo de una metodología para la detección cuantitativa de CO₂ y 1,3 pentadieno ha sido un trabajo que hemos desarrollado en colaboración con el grupo Tagralia de la ETSIA de la Universidad Politécnica de Madrid y la empresa “New Infrared Technologies”. Se trata de un aparato que emite rayos infrarrojos en un espectro de frecuencia media, que no necesita refrigeración y que permite medir la presencia de ambos gases de forma económica y fiable (19).

Las levaduras en los alimentos: ¿Amigas o enemigas?

La respuesta a esta pregunta después de haber llegado hasta aquí, parece fácil: Depende de cómo las tratemos. En contraste con el área de la seguridad de los alimentos, donde hay enemigos declarados que deben estar siempre ausentes, en el área de la calidad lo que nos encontramos son levaduras que deben estar presentes, porque pueden ser beneficiosas, pero que mal escogidas y peor controladas pueden resultar perjudiciales. Como microorganismos que son, solo van a tener efectos macroscópicos, tanto buenos como malos, si la población alcanza un tamaño crítico, que hay que determinar porque puede ser muy variable e incluso puede ser diferente para ambos efectos.

La modelización y el subsecuente control del crecimiento microbiano que permite la microbiología predictiva son por tanto de especial interés en este caso. Sin embargo, la estructura del alimento es un factor que ha sido poco considerado hasta ahora en esta área. La modelización del crecimiento sobre alimentos sólidos es un trabajo que también estamos desarrollando en nuestro grupo y que ya está dando sus frutos (20-23). De esta forma iremos consiguiendo el objetivo de cualquier microbiólogo industrial: Que los microorganismos hagan lo que queremos y no hagan lo que no queremos.

PUBLICACIONES DEL GRUPO DE LEVADURAS DE INTERÉS INDUSTRIAL (UCM)
SOBRE ECOFISIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LEVADURAS DETERIORANTES DE
ALIMENTOS COMENTADAS EN ESTE TRABAJO.

Levaduras deteriorantes de alimentos con baja o media actividad de agua

- 1.-Beuchat, L.R., Jung Y., Deak T., Kefler T., Golden D.A., Peinado J.M. Gonzalo P., de Siloniz M.I. and Valderrama M.J. (1998) An interlaboratory study on the suitability of diluents and recovery media for enumeration of *Zygosaccharomyces rouxii* in high sugar foods. J. Food Mycol. 1:117-130.
- 2.-Leyva J.S., Manrique M., Prats L., Loureiro-Días M.C. and Peinado J.M. (1999) Regulation of fermentative CO₂ production by the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. Enz. Microbial. Tecnol. 24:270-275.
- 3.-de Silóniz M.I., Valderrama M.J. and 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 Protection, 63:651-654.
- 4.-Beuchat L.R., Frändberg E., Deak T, Almazora S.M., Chen J., Guerrero, S. López-Malo A., Ohlsson I., Olsen M., Peinado J. M., , Shnurer J., de Silóniz M.I., Tornai-Lehoczki T. (2001) Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. Int. J. Food Microbiol., 70:89-96.
- 5.-Marquina D., Llorente P., Santos A. and Peinado J.M. (2001) Characterization of the yeast population in low water activity foods . Adv. Food Sci., 23:63-67.
- 6.-Silva R. D., Sotoca R., Johansson B., Ludovico P, Sansonetty F., Silva M. T., Peinado J. M. and Corte-Real M. (2005) Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis. Molecular Microbiology 58:824-834.

Deterioro de Alimentos por producción de CO₂ fermentativo: Técnicas de identificación y tipado de las levaduras responsables.

- 7.-Quirós, M., Wrent, P., Valderrama, M. J., de Silóniz, M. I. and Peinado, J. M. (2004) β -glucuronidase based agar medium for the differential detection of the yeast *Debaryomyces hansenii* from foods. J. Food Protection 68:802-804.
- 8.- Quirós M, Martorell P, Querol A, Barrio E, Peinado JM y de Silóniz MI. (2008). Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): Taxonomic and phylogenetic implications. FEMS Yeast Res 8: 485-491.
- 9.-Quirós M, Martorell P, Valderrama MJ, Querol A, Peinado JM y de Silóniz MI. (2006). PCR-RFLP analysis of the IGS region of rDNA: a useful tool for the practical discrimination between species of the genus *Debaryomyces*. Anton Leeuw Int J G 90: 211-219.
- 10.- Romero P, Patiño B, Quirós M, González-Jaén T, Valderrama MJ, de Silóniz MI, Peinado JM. (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.
- 11.-Wrent P, Rivas EM, Peinado JM y de Silóniz MI. (2010). Strain typing of *Zygosaccharomyces* yeast species using a single molecular method based on the intergenic spacer region (IGS). Int J Food Microbiol 142: 89-96.
- 12.-Wrent P, Rivas EM, Gil de Prado E, Peinado JM y de Silóniz MI. (2014). *Debaryomyces* in Encyclopedia of Food Microbiology, vol 1. Ed. Batt CA y Tortorello ML (eds). Elsevier Ltd, Academic Press, 563-570.

13.- Wrent P, Rivas E., Gil Prado E., Peinado J. M. and, de Silóniz. M.I.(2015) Assesment of the factor contributing to the growth or spoilage of *Meyerozyma guilliermondii* in organic yogurt: Comparison of methods for strain differentiation”. *Microorganisms*, 3:428-440.

14.-Wrent P., Rivas E., Gil Prado E., Peinado J. M. and . de Silóniz M.I. (2015) Development of species-specific primers for rapid identification of *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.*, 193:109-113. P. Wrent, E. Rivas, **J. M. Peinado** and M.I. de Silóniz.

15.-P. Wrent, E. Rivas, J. M. Peinado and M.I. de Silóniz.(2016) “Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers *Int. J. Food Microbiol.* 217:1-6. 2016.

Ácidos orgánicos como conservantes de alimentos: Bases fisiológicas de su toxicidad, y producción de 1-3 pentadieno (olor a petróleo) a partir de sorbato por levaduras

16.-Casas E., Valderrama M.J.,y Peinado J.M. (2004) Sorbate detoxification by spoilage yeasts isolated from marzipan products. *Food. Technol. Biotechnol.* 37:87-91.

17.-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.* 94:93-96.

18.-Leyva JS y Peinado JM. (2005). ATP requirements for benzoic acid tolerance in *Zygosaccharomyces bailii*. *J Appl Microbiol* 98: 121-126.

19.-Rivas E., Maldonado M., Diezma B, Wrent P., Peinado J. M., de Silóniz M.I., Vergara G., García-Hierro J., Robla J I and Barreiro P. (2015) Detection of Biological CO₂ and 1,3-Pentadiene Using Non-refrigerated Low-Cost MWIR Detectors. *Food Anal. Methods*: DOI 10.1007/s12161-015-0320-6.

Microbiología Predictiva: Modelos matemáticos del crecimiento de las levaduras en medios líquidos y sólidos y en presencia de conservantes.

20.-Barandica, J.M., Santos, A., Marquina, D., Acosta, F.J., Peinado, J.M. (1999) A Mathematical model for toxin accumulation by killer yeasts based on the yeast population growth. *J. Appl. Microbiol.* 86:805-811.

21.-Quintas C., Leyva J.S., Sotoca R., Loureiro-Días M.C. and Peinado J. M. (2005) A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *Int. J. Food Microbiol.* 100:125-130.

22.-Rivas E.M., Gil Prado E., Wrent P., Silóniz M.I, Barreiro P., Correa E. C., Conejero F., Murciano A., and Peinado J. M. (2014) A simple mathematical model that describes the growth of the area and the number of total and viable cells in yeast colonies. *Letters Appl. Microbiol.* 08/2014; DOI: 10.1111/lam.12314

23.- Gil de Prado E., Rivas E.M., Silóniz M.I. Diezma B, Barreiro P. and Peinado J.M. (2014) Quantitative analysis of morphological changes in yeast colonies growing on solid medium: The eccentricity and Fourier indexes. *Yeast* 08/2014; DOI: 10.1002/yea.3036.