



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de estrategias basadas en levaduras antagonistas
para el control de hongos alterantes en alimentos de origen
vegetal y animal**

CATALINA MILAGROS CABAÑAS CABEZAS

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS**

Conformidad del director y coodirectores

Alejandro Hernández León Alberto Martín González Santiago Ruiz Moyano Seco de Herrera

Esta tesis cuenta con la autorización del director y coodirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024

AGRADECIMIENTOS

Cuando inicié el grado en CYTA con 26 años, nunca imaginé que podría llegar a este momento, todo gracias a una oportunidad que pedí a mis padres. Para ellos fue un esfuerzo titánico. Por ello no tengo vida suficiente para agradecer la paciencia y confianza que pusieron en mí y a todas esas personas que me han ayudado y apoyado durante todo este camino, gracias de corazón.

Weep not for roads untraveled, weep not for paths left lone, 'cause beyond every bend is a long blinding end. (Linkin Park, 2012)

Además, quisiera agradecer especialmente a mis directores, todo el esfuerzo y tiempo que han invertido en crear esta tesis. Gracias al Dr. Alejandro Hernández, por ver en mí una futura investigadora y poner las bases de esta tesis. Gracias al Dr. Santiago Ruiz-Moyano que me ha acompañado en este camino y que también apostó por mí desde el principio, además, impulsando mi espíritu investigador. Al Dr. Alberto, por esa paciencia infinita y todos sus conocimientos.

Gracias a los proyectos de la Junta de Extremadura y de la Agencia Estatal de Investigación, IB16038 y RTI2018-096882-B100, respectivamente, y la Universidad de Extremadura, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias al consejo de sabias, ellas han sido el apoyo que he necesitado durante todo este camino. Sobre todo, por la comprensión. A Pura por su inestimable compañía durante esos largos tiempo de espera y su apoyo. A Iris, por su empatía durante todo este tiempo. Tengo que hacer una mención especial a la Dra. Almudena Vázquez, que primero fue mi profesora y después mi amiga, ella me ha ayudado a optimizar el tiempo y ver todo desde otro punto de vista.

Gracias a todos mis compañeros, José Manuel, Ana, Paula, Carlos, Juanjo, María, Cristina entre otros porque en ellos de alguna manera también contribuyeron a que este documento esté terminado. Además de todo mis compañeros y profesores de EIA, Pepa, Rocío, Emilio, Guía, Alicia, Paco, Juan, Mariano entre otros.

Agradecimientos

A mis padres, por todo lo dicho anteriormente, todo el apoyo que me han dado en perseguir mi sueño. A mi hermano Antonio, por enseñarme que el saber no ocupa lugar, a mi hermano Alfonso porque de él aprendí a ser una persona práctica y a mi hermano Jesús, que me enseñó que el trabajo no está reñido con la diversión. A mi cuñada, que me ha apoyado incondicionalmente en este camino y al pequeño de la casa, Daniel.

A mis amigas, Sandra, MJ y Laura, porque aún en la distancia, también me han apoyado.

Por último y no menos importante, a Sergio, por todo el ánimo que me ha dado, por ser paciente conmigo y escucharme y por enseñarme que puedes soñar todo lo alto que quieras.

A mi familia + 1.

ÍNDICE

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción general	3
	II.1 Mohos alterantes en alimentos.....	3
	II.2 Métodos de control.....	33
	II.3 Mecanismos de control de biológico.....	53
	II.4 Microorganismos antagonistas patentados.....	74
	II.5 Tendencias futuras	79
III.	Objetivos.....	83
	III.1 Objetivo General:	83
	III.2 Objetivos Específicos por Capítulo:	83
IV.	Estructura experimental.....	86
V.	Capítulo 1. Evaluación de la capacidad antagonista de levaduras aisladas de viñedos para el control de mohos alterantes de uva.....	89
	V.1 Resumen.....	89
	V.2 Material biológico y diseño experimental.....	90
	V.3 Resultados.....	106
	V.4 Discusión.....	118
	V.5 Conclusiones.....	125
VI.	Capítulo 2. Mejora de la vida útil de la cereza (<i>Prunus avium</i> L.) mediante la aplicación combinada de envasado en atmósfera modificada (MAP) y levaduras antagonistas para su exportación a larga distancia.	127
	VI.1 Resumen.....	127
	VI.2 Material biológico y diseño experimental.....	128
	VI.3 Resultados.....	136
	VI.4 Discusión.....	149
	VI.5 Conclusiones.....	153
VII.	Capítulo 3. Control biológico de mohos alterantes en quesos de pasta blanda de Extremadura.	155
	VII.1 Resumen.....	155
	VII.2 Material biológico y diseño experimental.....	157
	VII.3 Resultados.....	169
	VII.4 Discusión.....	194

Índice

VII.5	<i>Conclusiones</i>	205
VIII.	Capítulo 4. Levaduras con capacidad antagonista frente a otras levaduras alterantes y potencialmente patógenas aisladas de quesos de pasta blanda.	207
VIII.1	<i>Resumen</i>	207
VIII.2	<i>Material biológico y diseño experimental</i>	209
VIII.3	<i>Resultados</i>	219
VIII.4	<i>Discusión</i>	241
VIII.5	<i>Conclusiones</i>	249
IX.	Conclusiones.....	251
X.	Bibliografía.....	253
XI.	Anexo: Producción científica	349
XI.1	<i>Artículos científicos publicados</i>	350
XI.2	<i>Presentaciones en congresos</i>	352
XI.3	<i>Premios recibidos</i>	357
XI.4	<i>Colaboraciones científicas</i>	360

Índice de tablas

Tabla II.1. Especies de <i>Penicillium</i> asociadas a la pudrición de frutas (Modificada de Dukare <i>et al.</i> , 2020).....	14
Tabla II.2. Enfermedades que provoca <i>Alternaria alternata</i> en diversas frutas (Elaboración propia).....	17
Tabla II.3. Diversidad de hongos filamentosos causantes de alteración aislados de productos lácteos fermentados contaminados (Garnier <i>et al.</i> , 2017 ^a).	30
Tabla II.4. Condiciones y objetivos de la pasteurización de diferentes alimentos (Shenga <i>et al.</i> , 2010).....	36
Tabla II.5. Aditivos autorizados en derivados de frutas para el control de crecimiento de mohos (CODEX STAN 192-1995, Reglamento (CE) n° 1333/2008).....	43
Tabla II.6. Aditivos autorizados en quesos para el control del crecimiento de mohos (CODEX STAN 283-1978, Reglamento (CE) n° 1333/2008).	46
Tabla II.7. Levaduras antagonistas confrontadas con diferentes mohos y en diferentes alimentos (Elaboración propia)	51
Tabla II.8. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) antifúngicos producidos por levaduras. (Elaboración propia).....	66
Tabla II.9. Tipos de toxinas y especies de levaduras productoras (Adaptada de Freimoser <i>et al.</i> , 2019).....	70
Tabla II.10. Ejemplos de productos de biocontrol/biopreservación registrados hasta 2018 que consisten en bacterias, levadura o hongos similares a la levadura como ingrediente activo (Pretscher <i>et al.</i> , 2018; Sellitto <i>et al.</i> , 2021).	74
Tabla V.1. Concentración de los reactivos utilizadas en la PCR de la región ITS.....	94
Tabla V.2. Identificación de las especies de levaduras (especie, porcentaje de identificación y número de acceso de referencia), número de aislados y presencia de la especie por 10 racimos.	106
Tabla V.3. Parámetros de crecimiento (μ y fase de latencia) y porcentaje de reducción de micelios de <i>Penicillium glabrum</i> expuestos a compuestos orgánicos volátiles (VOC) producidos por las levaduras seleccionadas.	111
Tabla V.4. Porcentaje de esporas germinadas y tamaño del tubo germinativo (μ M) en contacto directo con las levaduras seleccionadas.	113
Tabla V.5. Ensayos de la caracterización de los mecanismos de biocontrol.....	114
Tabla VI.1. Evolución de los Sólidos Solubles Totales (SST), pH, acidez triturable (AT) y dureza de las cerezas tratadas durante el almacenamiento en frío (2°C).....	139
Tabla VI.2. Contenido de compuestos volátiles marcadores durante el almacenamiento en frío de las cerezas 'Burlat' en MAP.....	142
Tabla VI.3. Evolución de los sólidos solubles totales (SST), pH, acidez triturable (AT) y firmeza de las cerezas tratadas durante su vida útil.....	145
Tabla VI.4. Contenido de compuestos volátiles marcadores durante la vida útil de las cerezas 'Burlat' en MAP.....	148

Índice

Tabla VII.1. Levaduras aisladas usadas para el presente trabajo, indicando el código y su identificación (Merchán <i>et al.</i> , 2022).	160
Tabla VII.2. Condiciones empleadas en la modelización del impacto de las condiciones ambientales sobre la actividad antifúngica de las levaduras.	163
Tabla VII.3. Mohos aislados usados en el presente trabajo, indicando el código y la identificación.	169
Tabla VII.4. Estadísticos descriptivos de los radios de halos de inhibición originados por las levaduras seleccionadas con capacidad antagonista en el conjunto de condiciones ensayadas en el modelo experimental.	172
Tabla VII.5. Resultados ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta y condiciones óptimas en las que cada levadura obtendría un mejor control del crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> 1191.....	174
Tabla VII.7. Resultados del análisis de parasitismo de las cepas de levaduras frente a los mohos <i>Penicillium commune</i> 1031, <i>Fusarium verticillioides</i> 1191 y <i>Mucor plumbeus</i> 2367.	184
Tabla VII.8. Intensidad de las actividades enzimáticas pectinasa, β -glucanasa, quitinasa y proteasa de las diferentes levaduras aisladas.	186
Tabla VIII.1. Cepas de levaduras seleccionadas para el estudio de su actividad killer frente a cepas de levaduras de la especie <i>Y. lipolytica</i> con alta capacidad de pigmentación en queso (Merchán <i>et al.</i> , 2022).	212
Tabla VIII.2. Condiciones empleadas de % de NaCl, temperatura y pH durante el ensayo de modelización.	217
Tabla VIII.3. Estadísticos descriptivos de los atributos del color, Luminosidad (L*) Cromo (C*) y ángulo de matiz (h*) de la pigmentación por <i>Y. lipolytica</i> 918 (YL918) y las confrontaciones de <i>Debaryomyces hansenii</i> (DH).....	232
Tabla VIII.4. Análisis ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, evaluando el efecto de la concentración de NaCl (A), temperatura (B) y pH (C) en la pigmentación (Luminosidad L*, Cromo C* y ángulo de tono h*) causada por la levadura <i>Y. lipolytica</i> YL918 en los días D7 y D15 de ensayo.	236
Tabla VIII.5. Resultados ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, analizando la inhibición de la pigmentación (Parámetros del color: Luminosidad L*, Cromo C* y ángulo de tono h*) en las confrontaciones DH1206/YL918 y DH1249/YL918 bajo diferentes condiciones de NaCl (A), temperatura (B) y pH (C) 238	

Índice de figuras

Figura II.1. Desarrollo de <i>Botrytis</i> spp. en algunas frutas. De izquierda a derecha, en la primera fila: membrillo, fresa, kiwi, frambuesa. Segunda fila: kiwi baby, uvas de mesa, granada, arándano. Tercera fila: caqui, melocotón (infección a la izquierda), naranja, cereza. (Modificada de Romanazzi <i>et al.</i> , 2016)	10
Figura II.2. Deterioro en frutas cítricas causado por <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . A: síntomas de podredumbre acida (flecha) y B: Crecimiento fúngico tras varios días de la inoculación (Nazerian y Alian, 2013).....	19
Figura II.3. Alteración de las manchas negras causadas por la especie <i>Cladosporium oxysporum</i> en salchichón. (A) Rebanada de "salchichón" con crecimiento de hongos después de 20 días de incubación. (B) Rebanada de "salchichón" después de 20 días de incubación que muestra ennegrecimiento en la parte inferior después de raspar el crecimiento de micelio de moho de la superficie. Extraído de Lozano-Ojalvo <i>et al.</i> (2015).	27
Figura II.4. Esquema general de los métodos de control antifúngicos usados en la industria alimentaria (Elaboración propia).....	34
Figura II.5. Número de publicaciones científicas publicadas entre los años 2010 y 2023 con las palabras clave "Food" "antifungal" "bacteria" en gris y "Food" "antifungal" "yeast" en azul (Datos extraídos de la base de datos Scopus).....	49
Figura II.6. Características deseables de un microorganismo antagonista (Modificado de Carmona-Hernández <i>et al.</i> , 2019).....	54
Figura II.7. Evolución del número de publicaciones en el periodo 2010 a 2022 con las palabras clave en naranja "Fruit" "antifungal" "bacteria", en gris "Fruit" "antifungal" "yeast", en amarillo "Meat" "antifungal" "bacteria" y en celeste "Meat" "antifungal" "yeast", en verde "Dairy" "antifungal" "bacteria" y em azul oscuro "Dairy" "antifungal" "yeast" (Datos extraídos de la base de datos Scopus).	55
Figura II.8. Principales mecanismos de biocontrol por parte de las levaduras antagonistas (Elaboración propia).....	56
Figura II.9. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la interacción entre las hifas de <i>Meyerozyma caribbica</i> L6A2 y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> inoculadas mediante pipeteo directo sobre las heridas del mango (a y b) e inoculadas en PDB (c) después de 36 h. Se observa la formación de biofilm (BFF) y deformación de hifas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (DCgH). Ampliación de 900x (a), 3200x (b) y 4000x (C) (Bautista-Rosales <i>et al.</i> , 2013).	59
Figura II.10. Ejemplo de parasitismo entre levadura antagonista y patógeno fúngico. En la fotografía a (40x) y b (100x) la interacción entre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CG) y <i>Meyerozyma caribbica</i> (MC) después de 48 h. En las imágenes c (40x) y d (100x) no se observa adhesión por el control negativo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Bautista-Rosales <i>et al.</i> , 2013).....	64
Figura IV.1. Diseño experimental de esta tesis doctoral, así como el objetivo general y los específicos de cada capítulo.....	87

Índice

Figura V.1. Condiciones climáticas durante el crecimiento de la uva durante el año 2018, en él se pueden observar las temperaturas máximas, mínimas y medias expresada en °C, las precipitaciones expresadas en L/m ² . (http://redarexplus.gobex.es).	90
Figura V.2. Esquema general del diseño experimental que se siguió durante el desarrollo del Capítulo 1 (Elaboración propia).	92
Figura V.3. Diagrama del área de recuento de la cámara de Neubauer, en el cuadro n°3 es donde se realizó el recuento (Vega y Voltolina, 2007).	97
Figura V.4. Sistema de doble placa (DDS) utilizado para la determinación de la producción de compuestos volátiles antifúngicos. Detalle del proceso de extracción de los compuestos volátiles mediante microextracción en fase sólida (Modificado de Ruiz-Moyano <i>et al.</i> , 2020).	100
Figura V.5. Esquema de la ubicación de las inoculaciones del mohó (X) y de las cepas de levaduras (L) (Capilla, 2017).	101
Figura V.6. Gel de agarosa de los perfiles ISSR-PCR de 5 aislados de <i>P. glabrum</i> con los cebadores (A) (CAG)4; (B) (GTG)5; (C) UBC809 y (D) UBC817. Los perfiles de banda S1 y S2 muestran los perfiles de los dos subgrupos genéticos de <i>P. glabrum</i>	108
Figura V.7. Imágenes del enfrentamiento directo entre <i>Penicillium glabrum</i> y <i>Hanseniaspora uvarum</i> (A), <i>Hormonema viticola</i> (B), <i>Aureobasidium pullulans</i> (C, F); <i>Zygoascus meyeræ</i> (D) y <i>Pichia terricola</i> (E).	109
Figura V.8. Porcentaje de incidencia de la enfermedad y síntomas de enfrentamiento en uvas heridas a 25°C entre <i>Penicillium glabrum</i> 1307 (A), 204 (B) y los aislados de levadura <i>Pichia terricola</i> L14, <i>Pichia kudriavzevii</i> L18, <i>Hormonema viticola</i> L21, <i>Zygoascus meyeræ</i> L29, <i>Aureobasidium pullulans</i> L30 y L31 y <i>Hanseniaspora uvarum</i> L35. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,050$) en cada día de muestreo.	117
Figura V.9. Perfil representativo de compuestos volátiles en los sistemas de doble de las placas control (<i>Penicillium glabrum</i> , línea azul) y confrontadas (<i>Penicillium glabrum</i> + levaduras; línea roja). Los números indican los compuestos asociados al crecimiento de las levaduras. La tabla relaciona el número de picos, los tiempos de retención y la identificación de los compuestos (por base de datos NIST, índice de Kovats) de las levaduras productoras	123
Figura VI.1. Cerezas siendo sometidas a higienización en agua a 5°C en hidrocooler (Kronen, DS1000, Alemania).	129
Figura VI.2. Esquema general del diseño experimental del ensayo de envasado de cerezas en MAP combinado con tratamientos de antifúngico sintético y levaduras antagonistas junto con los nuestros realizados durante el ensayo (Elaboración propia).	131
Figura VI.3. Presiones parciales (A) kPa O ₂ y (B) kPa CO ₂ y (C) porcentajes de pérdida de peso de cerezas 'Burlat' envasadas en atmósferas modificadas pasivas a 2°C y tratadas con <i>Metschnikowia pulcherrima</i> L672 (MPL672: en verde), <i>Pichia kudriavzevii</i> PK18 (PK18: en amarillo), fludioxonil (en rojo) y control (en azul). HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey); SSB: barra de significación estadística.	136
Figura VI.4. Recuentos de (A) microorganismos mesófilos aerobios totales, (B) levaduras y (C) porcentaje de incidencia de la podredumbre en cerezas 'Burlat' envasadas en atmósfera pasiva modificada a 2°C y tratadas con <i>Metschnikowia pulcherrima</i> L672	

(MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo) y control (en azul). HSD Tukey: diferencia significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística. 137

Figura VI.5. Parámetros de color: (A) luminosidad L*, (B) cromaticidad C*, y (C) ángulo de tono H* de (1) la piel y (2) la pulpa de cerezas "Burlat" envasadas en atmósfera modificada a 2 °C y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo) y control (en azul). HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística. 141

Figura VI.7. Recuentos de (A) microorganismos mesófilos aerobios totales (TAM), (B) levaduras, y (C) porcentaje de incidencia de pudrición de cerezas 'Burlat' envasadas en atmósfera modificada pasiva y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo), y control (en azul). Las cerezas se almacenaron a 2 °C y se colocaron 2 días a 25 °C para simular su vida útil. HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística. 143

Figura VI.7. Parámetros de color (A) luminosidad L*, (B) cromaticidad C*, y (C) ángulo de tono h* de (1) la piel y (2) la pulpa de cerezas "Burlat" envasadas en atmósfera modificada pasiva y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo), y control (en azul). Las cerezas se almacenaron a 2 °C y se colocaron 2 días a 25 °C para simular su vida útil. HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística. 147

Figura VII.1. Esquema general que se siguió durante el desarrollo de este capítulo (Elaboración propia). 158

Figura VII.2. Mapa de calor de las diferentes especies de levaduras respecto a las diferentes actividades antagonistas en los ensayos de confrontación directa. Los datos utilizados el mapa térmico son la abundancia relativa de los diferentes tipos de actividades. Tanto en las columnas como en las filas se agrupan utilizando la distancia euclidiana y el enlace medio. La escala de varianza unitaria se aplica a las filas. La escala de colores representa la escala de abundancia relativa de cada cepa (PS, *Pichia sporocuriosa*; PF, *Pichia fermentans*; YA, *Yarrowia alimentaria*; CZ, *Candida zeylanoides*; DH, *Debaryomyces hansenii*; PK, *Pichia kudriavzevii*; YL, *Yarrowia lipolytica*; PJ, *Pichia jadinii*; GC, *Geotrichum candidum*; KL, *Kluyveromyces lactis*; KM, *Kluyveromyces marxianus*) que mostro esa actividad en todos los ensayos, con el color azul oscuro indicando una abundancia alta y con blanco, nula abundancia. 171

Figura VII.3. Porcentajes de reducción del crecimiento de *Penicillium commune* 1031 asociado a los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por las levaduras seleccionadas. En el eje de ordenadas, valores positivos significan reducción del crecimiento, valores negativos significan aumento del crecimiento micelial. Se distingue las especies por color, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * indica las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística. 176

Figura VII.4. Porcentajes de reducción del crecimiento de *Fusarium verticillioides* 1191 asociado a los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por las levaduras seleccionadas. En el eje de ordenadas, valores positivos significan reducción del

Índice

crecimiento, valores negativos significas aumento del crecimiento micelial. Se distingue las especies por color, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. *, indica las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística. 177

Figura VII.5. Porcentajes de reducción del crecimiento de *Mucor plumbeus* 2367 asociado a los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por las levaduras seleccionadas. En el eje de ordenadas, valores positivos significan reducción del crecimiento, valores negativos significas aumento del crecimiento micelial. Se distingue las especies por color, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * indica las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística. 178

Figura VII.6. Análisis de los componentes principales 1 (26,4% de la variabilidad) y 2 (15,6% de la variabilidad) las confrontaciones (A) entre las levaduras *Kluyveromyces lactis* KL890, *Kluyveromyces lactis* KL904, *Kluyveromyces marxianus* KM1070, *Pichia jadinii* PJ173, *Yarrowia alimentaria* YA1476 y *Candida zeylanoides* CZ350 con el moho alterante *Fusarium verticillioides* 1191 a los 3 (D3) y 7 días (7D) de ensayo y los compuestos volátiles producidos en los espacios de cabeza (B). Los controles representan VOCs producidos por el crecimiento en el medio de los mohos alterantes en los ensayos sin levaduras. PDA representa los controles negativos sin inóculos. 180

Figura VII.7. Porcentajes de germinación de *Penicillium commune* 1191 frente a las levaduras seleccionadas. Se distingue las especies por color, en azul el control, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. SSB: barra de significación estadística. 181

Figura VII.8. Porcentajes de germinación de *Fusarium verticillioides* 1191 frente a las levaduras seleccionadas. Se distingue las especies por color, en azul el control, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * representa las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística. 182

Figura VII.9. Porcentajes de germinación de *Mucor plumbeus* 2367 frente a las levaduras seleccionadas. Se distingue las especies por color, en azul el control, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * representa las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística. 183

Figura VII.10. Imagen de la adhesión de *Geotrichum candidum* 663 a los diferentes mohos *Penicillium commune* 1031 (A), *Fusarium verticillioides* 1191 (B), y *Mucor plumbeus* 2367 (C). 184

Figura VII.11. Determinación de la capacidad de formar biofilm (expresado en valores de absorbancia a 590 nm). Se distingue las especies por color, en azul el control, la cepa *Kluyveromyces marxianus* 2459, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *P. jadinii*. 187

Figura VII.12. Mapa de calor de la capacidad de competir por hierro (naranja) y manganeso (gris) de las diferentes levaduras seleccionadas por halo de inhibición a las concentraciones reflejadas en el eje inferior (en $\mu\text{g/mL}$) enfrentadas a *Mucor plumbeus* 2367. Los datos utilizados el mapa térmico son la abundancia relativa de los diferentes halos producidos. Tanto en las columnas como en las filas se agrupan utilizando la

distancia euclidiana y el enlace medio. La escala de varianza unitaria se aplica a las filas. La escala de colores representa la escala de abundancia relativa de la intensidad del halo de las diferentes cepas (PJ, *Pichia jadinii*; GC, *Geotrichum candidum*; KL, *Kluyveromyces lactis*; KM, *Kluyveromyces marxianus*), con el color rojo oscuro indicando una abundancia alta y con azul oscuro, nula abundancia. 188

Figura VII.13. Crecimiento diametral de *Penicillium commune* 1031 frente a las levaduras investigadas a lo largo de los de los 11 días de confrontación en cuñas de queso tierno. Se distingue las especies por color: en azul los controles Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, cepa control sin actividad; en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. Los diferentes días de crecimiento se muestran con diferentes texturas. * indica las cepas de levaduras que produjeron inhibición significativa ($p \leq 0,050$). 189

Figura VII.14. Ensayo *in vivo* en queso tierno de *Penicillium commune* 1031 en el día 9 del ensayo. Se distingue: Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, GC663 = *Geotrichum candidum* 663, KL1351 = *Kluyveromyces lactis* 1351, KL1507 = *K. lactis* 1507, PJ171 = *Pichia jadinii* 173; PJ433 = *P. jadinii* 433. 190

Figura VII.15. Crecimiento diametral de *Fusarium verticillioides* 1191 frente a las levaduras investigadas a lo largo de los de los 11 días de confrontación en cuñas de queso tierno. Se distingue las especies por color: en azul los controles Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, cepa control sin actividad; en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. Los diferentes días de crecimiento se muestran con diferentes texturas. * indica las cepas de levaduras que produjeron inhibición significativa ($p \leq 0,050$). 191

Figura VII.16. Ensayo *in vivo* en queso tierno de *Fusarium verticillioides* 1191 en el día 9 del ensayo. Se distingue: Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, GC663 = *Geotrichum candidum* 663, KL1351 = *Kluyveromyces lactis* 1351, KL1507 = *K. lactis* 1507, PJ171 = *Pichia jadinii* 173; PJ433 = *P. jadinii* 433. 191

Figura VII.17. Crecimiento diametral de *Mucor plumbeus* 2367 frente a las levaduras investigadas a lo largo de los de los 11 días de confrontación en cuñas de queso tierno. Se distingue las especies por color: en azul los controles Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, cepa control sin actividad; en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. Los diferentes días de crecimiento se muestran con diferentes texturas. * indica las cepas de levaduras que produjeron inhibición significativa ($p \leq 0,050$). 192

Figura VII.18. Ensayo *in vivo* en queso tierno de *Mucor plumbeus* 2367 en el día 8 del ensayo. Se distingue: Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, GC663 = *Geotrichum candidum* 663, KL1351 = *Kluyveromyces lactis* 1351, KL1507 = *K. lactis* 1507, PJ171 = *Pichia jadinii* 173; PJ433 = *P. jadinii* 433. 193

Figura VIII.1. Alteración de color rosada en queso de pasta blanda producida por *Yarrowia lipolytica*. 210

Índice

Figura VIII.2. Esquema general que se siguió durante el desarrollo de este capítulo (Elaboración propia).....	211
Figura VIII.3. Porcentajes de cepas de levaduras, clasificadas en 3 rangos, que presentaron halo frente a las cepas de <i>Yarrowia lipolytica</i> (YL918, YL1202 y YL2714). Se distingue por colores las distintas especies, en verde <i>Candida zeylanoides</i> , en azul oscuro <i>Debaryomyces hansenii</i> , en lila, <i>Kluyveromyces lactis</i> , en amarillo <i>K. marxianus</i> , en rojo <i>Pichia fermentans</i> , en naranja <i>Pichia jadinii</i> , en azul claro <i>Pichia kudriavzevii</i> y en rosa <i>Yarrowia alimentaria</i> . Se distingue por texturas rangos de halo de inhibición.	220
Figura VIII.4. Actividad antagonista (mm de halo) de las especies seleccionadas (A) <i>Debaryomyces hansenii</i> , (B) <i>Pichia jadinii</i> , y (C) <i>Kluyveromyces lactis</i> frente a las levaduras alterantes <i>Yarrowia lipolytica</i> (YL918 en azul, YL1202 en verde, y YL2714 en rojo) en las diferentes condiciones de pH, concentración de NaCl y temperatura.	222
Figura VIII.5. Análisis de clúster jerárquico de los datos de inhibición del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> (YL918, YL1202 y YL2714) por las cepas de DH (<i>Debaryomyces hansenii</i>), PJ (<i>Pichia jadinii</i>) y KL (<i>Kluyveromyces lactis</i>) en las condiciones de pH, NaCl y temperatura ensayadas.	224
Figura VIII.6. Análisis de clúster jerárquico de los datos de inhibición del crecimiento de <i>Yarrowia lipolytica</i> alterantes (YL918, YL1202 y YL2714) por las cepas de DH (<i>Debaryomyces hansenii</i>) en las condiciones de pH, NaCl y temperatura ensayadas.	225
Figura VIII.7. Diferencial de actividad antagonista (mm de halo) del grupo 2 (cepas DH933, DH1232, DH1860 y DH 1760) menos el grupo 1 (cepas DH1249 y DH910) frente a las levaduras alterantes <i>Yarrowia lipolytica</i> (YL918 en azul, YL1202 en verde y YL2714 en rojo).	226
Figura VIII.8. Modificación del color (expresado en las coordenadas del espacio CIELab L*= luminosidad, a* = eje rojo-verde; b* = eje amarillo-azul) del medio agar leche tirosina durante 12 días inoculado con <i>Yarrowia lipolytica</i> 918.	228
Figura VIII.9. Absorbancias del medio agar leche-tirosina inoculado con las levaduras seleccionadas frente a <i>Yarrowia lipolytica</i> 918 durante 12 días. Se distinguen las especies por color, en azul el control negativo, en rosa el control positivo (YL918 sin coinoculación), en naranja <i>Pichia jadinii</i> PJ433, en verde <i>Debaryomyces hansenii</i> DH1206 y en violeta <i>D. hansenii</i> DH1249. En color claro representado los resultados obtenidos a pH 4 y en oscuro a pH 5,5.	229
Figura VIII.10. Imagen de los diferentes bloques con sus condiciones de ensayo en medio de agar tirosina en el día 7 para las levaduras YL918, DH1206/YL918 y DH1249/YL918.	233
Figura VIII.10. Imagen de los diferentes bloques con sus condiciones de ensayo en medio de agar tirosina en el día 15 para las levaduras YL918, DH1206/YL918 y DH1249/YL918.	235

RESUMEN

I. Resumen

Entre las principales causas que acortan la vida útil de los alimentos destaca el desarrollo de múltiples especies fúngicas que alteran y pueden representar además un riesgo sanitario. Para su control, el enfoque actual de implementar en la cadena alimentaria tecnologías que mejoren la sostenibilidad de los sistemas ha permitido el desarrollo de estrategias de control biológico mediante microorganismos antagonistas. En este sentido, esta Tesis Doctoral explora el empleo de levaduras antagonistas como nueva alternativa para el control de las alteraciones fúngicas en frutas y quesos. Para ello se han aislado, identificado y caracterizado levaduras antagonistas y mohos causantes de alteración procedentes de frutas y quesos. Las pruebas *in vitro* han permitido identificar varias levaduras con antagonismo asociado a la producción de compuestos orgánicos volátiles, competición por espacio y nutrientes, producción de enzimas líticas, parasitismo, etc., así como modelizar su comportamiento en las condiciones ambientales de aplicación. En frutas, la aplicación de *Zygoascus meyeri* L29 y *Pichia kudriavzevii* PK18 permitió el control de podredumbres en uvas por *Penicillium glabrum*. Además, *P. kudriavzevii* PK18 y *Metschnikowia pulcherrima* L672 aumentaron la vida útil de cerezas en sistemas de atmósferas controladas. En quesos, *Pichia jadinii* 433 demostró su eficacia en el control de alteraciones causadas por diferentes mohos en la corteza, mientras que *Debaryomyces hansenii* 1249 limitaba la pigmentación rosa asociada a *Yarrowia lipolytica*. Estos resultados ponen de manifiesto la idoneidad de las levaduras autóctonas antagonistas como método sostenible para el control de alteraciones fúngicas en productos de origen vegetal y animal.

INTRODUCCIÓN GENERAL

II. Introducción general

II.1 Mohos alterantes en alimentos

En septiembre del 2015, en la asamblea general de las Naciones Unidas adoptó una agenda de desarrollo sostenible, denominada la **Agenda 2030**. En ella se llegó a un compromiso de 17 objetivos para llegar a un futuro más justo y pacífico. Estos objetivos incluyen desde la eliminación de la pobreza hasta el combate al cambio climático, la educación, la igualdad de la mujer, la defensa del medio ambiente o el diseño de nuestras ciudades (United Nations, 2015). Uno de **los principales desafíos a los que se enfrenta la humanidad es la falta de higiene y seguridad alimentaria** debido a la contaminación por microorganismos, que hacen que los alimentos sean inadecuados para su consumo.

El **deterioro de los alimentos** se puede definir como los procesos fisicoquímicos y microbiológicos que hace que los alimentos sean indeseables o inaceptables para el consumo humano debido a una disminución en su calidad que ocasiona cambios en las características sensoriales de los mismos, esto los vuelve indeseables y no aptos para el consumo, tanto para animales como para humanos. Los alimentos deteriorados o alterados, aunque en ocasiones puedan ser seguros para la ingesta, es decir, aunque es posible que no causen enfermedades porque no hay patógenos o una toxina presente, son rechazados por los cambios en la textura, el olor, el sabor o la apariencia (Blackburn, 2006; Rawat, 2015; Lianou, *et al.*, 2016). El deterioro de los alimentos **genera enormes pérdidas económicas en la industria alimentaria**, además de a los productores (agricultores y ganaderos), minoristas y consumidores, así como a la insatisfacción de los consumidores (Snyder y Worobo, 2018; Garnier *et al.*, 2020; Odeyemi *et al.*, 2020). Diversos factores intrínsecos y extrínsecos pueden aumentar este deterioro (Odeyemi *et al.*, 2019). Entre ellos, se pueden citar las condiciones de almacenamiento (Bradford *et al.*, 2018; Mageswari *et al.*, 2015; Ndraha, *et al.*, 2018; Odeyemi, *et al.*, 2018), pH, composición química, microbiota autóctona presente (Ioannidis *et al.*, 2018), operaciones de procesamiento (Wang *et al.*, 2018), transporte (Hammond *et al.*, 2015) y los manipuladores de alimentos.

Dentro de los microorganismos que deterioran los alimentos, los mohos son los más resistentes y capaces de superar las estrategias de control utilizadas en la cadena alimentaria, ya que pueden crecer dentro de una amplia gama de valores de

Introducción general

actividad del agua, de pH y temperaturas (Snyder y Worobo, 2018). Gock *et al.* (2003) mostraron que temperaturas, pH y actividades de agua presentes en productos horneados y dulces facilitaban el desarrollo de mohos alterantes, indicando que los mohos germinaban más rápido a pH ácidos que neutros. En relación con la temperatura, la proximidad a 25°C favorecería el desarrollo fúngico, y en cuanto a la actividad de agua, valores en torno a 0,92 se describen como los más favorables. Pitt y Hocking (2009^a) comprobaron que el rango de a_w para el crecimiento de los mohos es bastante amplio, **desde 0,60 a 0,95, siendo la a_w óptima 0,90**. En relación con el pH, el crecimiento se produce en un rango que va de **un pH ácido de 3 a un pH ligeramente básico de 8**, siendo el óptimo un pH 5. En cuanto a la temperatura existen mohos que crecen a temperaturas por debajo de 0°C (concretamente -7°C) hasta temperaturas que van hasta los 45°C, siendo la **óptima entre 20-25°C**.

Los mohos pueden usar un gran número de sustratos presentes en los alimentos como hidratos de carbono, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos (Dagnas y Membré, 2013). En consecuencia, los mohos pueden crecer en productos ácidos como frutas o jugos de frutas (Lahlali *et al.*, 2005) y en alimentos con niveles intermedios de humedad como pan y productos de panadería donde otros microorganismos como bacterias no pueden crecer; también en alimentos como cereales, bebidas, productos lácteos y productos fermentados, así, por lo tanto, se asocian con el deterioro de una amplia gama de alimentos (Rawat, 2015). Debido a **su carácter ubicuo** es normal encontrarlos como habitantes naturales del suelo y contaminantes del aire y agua, y de ahí podrían pasar a los alimentos. Esta **contaminación puede provenir** de diferentes fuentes:

- El **agua**, ya que puede ser un vehículo de esporas de mohos por lo que es imprescindible que en el proceso de elaboración y manipulación de los alimentos se use agua potable.
- Las **materias primas**, deben ser de calidad que cumplan con los requisitos higiénicos preestablecidos para los distintos alimentos.
- El **ambiente**, es necesario que este bien ventilado la zona de manipulación de alimentos para que esté lo menos contaminado posible, además de una renovación continua del aire.

- El **hombre**, es el mayor factor de riesgo en cuanto a contaminación de alimentos se refiere, debido al contacto continuo con los microorganismos.
- El uso de **utensilios y equipos**, han de ser higienizados continuamente para impedir que el nivel de microorganismos suponga un riesgo.
- La presencia de **roedores, insectos, aves**. Pueden padecer y transmitir enfermedades provocadas por microorganismos.

Así, los mohos pueden contaminar y crecer en la superficie de los alimentos formando micelios esponjosos y dar lugar a masas de esporas para su propagación (Al-hindi, 2013). El crecimiento de determinados mohos en algunos alimentos como quesos azules o productos cárnicos curados **puede ser deseable**, sin embargo, en general su crecimiento en los alimentos ocasiona **alteración** de estos produciendo cambios en las características organolépticas de los alimentos, así como una reducción del valor nutritivo, la putrefacción e incluso pueden representar un riesgo potencial o real para la salud del consumidor (Shah y Khan, 2014). En este sentido se trata de un grupo de microorganismos muy diverso **con capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios** (Lima y Santos, 2017). Estos pueden comprender enzimas, ácidos orgánicos y antibióticos, por lo que son muy útiles para producir alimentos fermentados. Un ejemplo de ello son los quesos azules elaborados con *Penicillium roqueforti*. También ocurre esto en los quesos Brie y Camembert que son inoculados con *Penicillium camemberti* (Chávez *et al.*, 2011). Aunque no todos estos metabolitos secundarios son beneficiosos ya que también pueden deteriorar gran variedad de alimentos, desde las materias primas hasta los productos elaborados o incluso ser tóxicos para la salud como las micotoxinas (Quéro *et al.*, 2019).

Las micotoxinas son perjudiciales para la salud humana y animal (Ashiq, 2015, Jeswal y Kumar, 2015). Las micotoxinas pueden ser cancerígenas, mutagénicas, genotóxicas, teratogénicas, neurotóxicas y estrogénicas, incluida la toxicidad para la reproducción y el desarrollo (Fung y Clark, 2004; Jestoi, 2008; Köppen *et al.*, 2010). En general, se caracterizan por ser **compuestos de bajo peso molecular, ser estables a las temperaturas y bajos pH** encontrados comúnmente en el estómago de los animales (Pfliegler *et al.*, 2015). Esta producción de toxinas además puede verse potenciada por diversos factores como la ubicación geográfica, las condiciones climáticas, los métodos agrícolas y la susceptibilidad de los alimentos al crecimiento del moho durante el

Introducción general

procesado y periodos de almacenamiento (Jonathan y Esho, 2010). Los principales mohos responsables de contaminación y problemática en alimentos y piensos con micotoxinas son miembros de los **géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*** (Marin *et al.*, 2013). Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, sin embargo, solo algunos tipos de éstas son encontradas habitualmente en alimentos y piensos. Las más importantes son aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, patulina, zearalenona y tricotecenos, incluidos el deoxinivalenol y la toxina T-2 (De Boevre *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014).

II.1.1 Alteración fúngica en alimentos de origen vegetal

Los alimentos de origen vegetal comprenden un gran número de alimentos diferentes, por ello y debido a las diferentes características que presentan es necesario hacer una división de estos y hablar de los mohos contaminantes asociados a cada uno de ellos.

II.1.1.1 Hortalizas

Las hortalizas son órganos de plantas con alto contenido de humedad y consisten en tejidos que se pueden comer crudos o cocidos como parte del plato principal (Enyiukwu *et al.*, 2020). Tienen unos perfiles nutricionales muy importantes ya que aportan vitaminas y minerales esenciales en la dieta (Afolabi *et al.*, 2012). Debido a su **alto contenido de humedad y a su pH casi neutro**, las verduras **son alimentos perecederos** (Ramos *et al.*, 2013; Yousuf *et al.*, 2018). Los microorganismos que descomponen estos alimentos parasitan al huésped mediante enzimas líticas extracelulares que degradan estos polímeros para liberar agua y otros componentes intracelulares de la planta para usarlos como nutrientes para su crecimiento (Raja *et al.*, 2012). La presencia y el número de microorganismos difieren según el tipo de producto, las prácticas agronómicas, el área geográfica de producción y las condiciones climáticas antes de la cosecha (Olaimat y Holley, 2012).

La contaminación de las verduras, como se ha mencionado antes, puede ocurrir **en cualquier momento de la cadena alimentaria**, es decir, tanto en pre como en postcosecha, desde los campos de cultivo e invernaderos hasta el plato del consumidor, pasando por el transporte, la distribución y los mercados con presencia o ausencia de patógenos (Adjrah *et al.*, 2013). Otras posibles fuentes de microorganismos incluyen suelo, heces (de origen humano y animal), agua (riego, limpieza), hielo, animales

(incluidos insectos y aves), manipulación del producto, equipo de recolección y procesamiento y transporte (Jiang *et al.*, 2017).

Muchas hortalizas, como el brócoli, la coliflor, etc. no son particularmente propensas al ataque de mohos, ya que a menudo son más rápidamente infectadas y deterioradas por bacterias, lo que resulta en un bajo recuento de mohos (Tournas, 2005). Estos alimentos **son más susceptibles a las bacterias** debido a que las hortalizas presentan valores de pH casi neutros. Las hortalizas más ácidas son susceptibles de deteriorarse por organismos acidófilos (Al-hindi, 2013). **La microbiota alterante** de las hortalizas se compone principalmente de bacterias como *Pseudomonas spp.*, *Erwinia herbicola*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas* y *Enterobacter agglomerans*. También se encuentran comúnmente bacterias ácido lácticas, como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus spp.* (De Azeredo *et al.*, 2011; Caponigro *et al.*, 2010; Pianetti *et al.*, 2008). Aunque *Pseudomonas spp.* es normalmente dominante y puede constituir del 50 al 90% de la población microbiana en muchas verduras (Arvanitoyannis *et al.*, 2009). **Los patógenos** transmitidos por los alimentos, incluidos *Escherichia coli O157: H7*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, a menudo están presentes en la superficie de los productos frescos y pueden causar problemas de salud pública (Qadri *et al.*, 2015). Hay algunas verduras que al entrar en contacto con el suelo pueden albergar otros microorganismos patógenos, como puede ser *Clostridium spp.* y *Staphylococcus aureus* (Seo *et al.*, 2010). En cuanto a mohos, se pueden encontrar especies de los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* (Ramos *et al.*, 2013).

El deterioro por mohos, cuando se produce, comienza en el campo, pero se propaga rápidamente durante el transporte y almacenamiento, especialmente si la temperatura de los productos se mantiene por encima de los 10°C. Este trastorno se manifiesta, en general, por la formación de lesiones de color marrón a negro verdoso de tamaño y textura variables (Tournas, 2005). Uno de los géneros de mohos más comunes que se encuentra en hortalizas, como se ha mencionado antes es *Alternaria*. La especie *Alternaria brassicae* provoca un **tizón** en la planta de la col, aunque también se ha encontrado en la semilla de la mostaza (Manika *et al.*, 2013). Las especies *Alternaria dauci*, *Alternaria porri*, *Alternaria solani* y *Alternaria tomatophila* producen la enfermedad del tizón en zanahorias, cebollas, patatas y tomates, respectivamente (Chalupová *et al.*, 2014). *Alternaria radicina* causa la pudrición en la zanahoria,

Introducción general

Alternaria brassicicola, *Alternaria euphorbiicola* y *Alternaria japonica* crece en cultivos de col, además en estos cultivos también se han aislado *Alternaria dianthi* y *Alternaria dianthicola*, y *Alternaria panax* causa tizón del ginseng (Mamgain *et al.*, 2013).

Hay **otros mohos** que son igualmente prevalentes, como demuestra el ensayo de Jeddi *et al.* (2014), donde el moho más frecuentemente aislado en hortalizas fue *Cladosporium spp.*, seguido de *Penicillium spp.* y en mucho menor medida aislaron *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Geotrichum spp.* Por ejemplo, *Rhizopus stolonifer* es el agente causante de la pudrición blanda en el repollo, las coles de Bruselas y la coliflor. La enfermedad se manifiesta por una apariencia blanda del producto afectado. Suele estar presente un micelio grueso con esporangios oscuros (Ruiz-Cruz y Arvizu-Medrano, 2010).

II.1.1.2 Frutas

Las frutas juegan un papel importante en la nutrición humana porque contribuyen con factores de crecimiento como pueden ser vitaminas y minerales en la dieta humana, manteniendo así una buena salud (Abdullah *et al.*, 2016). Además, su estructura está compuesta principalmente por polisacáridos de celulosa, hemicelulosa y pectina. Por su composición presentan unas condiciones casi ideales para la supervivencia y el crecimiento de muchos tipos de microorganismos. Están expuestas a la contaminación por microorganismos a través del contacto directo con el suelo, el polvo, el agua y por la manipulación en la cosecha o durante el procesamiento postcosecha (Ewekeye *et al.*, 2013). Algunos microorganismos pueden entrar en los tejidos vegetales a través del cáliz o el tallo o de las estructuras encargadas del intercambio de agua y gases de la materia foliar (Barth *et al.*, 2009). Esta **contaminación de las frutas por microorganismos ocasiona pérdidas tanto es precosecha como en postcosecha**. Estas pérdidas pueden alcanzar el 25% en países industrializados y el 50% en países en desarrollo (Nunes, 2012).

Las frutas, contienen altos niveles de azúcares y otros nutrientes, y poseen una actividad acuosa ideal para el crecimiento microbiano; sin embargo, **su bajo pH las hace particularmente susceptibles al deterioro por mohos**, y en menor medida a levaduras y bacterias ácido-lácticas (Rawat, 2015; Roberts *et al.*, 2005; Tournas y Katsoudas, 2005). El pH de las frutas es habitualmente inferior a 4,5, aunque algunas frutas como el melón,

el plátano o el higo puede tener un pH superior. Los mohos producen una gran cantidad de pectinasas y hemicelulasas extracelulares que son factores importantes para el deterioro de estos alimentos (Miedes y Lorences, 2004).

Las especies más frecuentes suelen ser miembros pertenecientes a los géneros *Botrytis*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Sclerotinia* (Singh y Sharma, 2018).

- **Botrytis spp.**

Botrytis spp. y en especial la especie ***Botrytis cinerea*** son patógenos importantes de cultivos ornamentales, de frutas, hortalizas y leguminosas. Las enfermedades inducidas por *Botrytis* se pueden encontrar en viveros, campos, invernaderos y almacenes (Carisse y Van der Heyden, 2015). Tanto es así, que es uno de los hongos patógenos necrotróficos más ampliamente estudiados ya que produce la pudrición del moho gris en más de 500 especies de plantas (Hua *et al.*, 2018). De acuerdo con revisiones recientes, este moho ocupa el **segundo puesto entre los 10 principales hongos patógenos del mundo según su importancia científica y económica**, siendo el primero el moho *Magnaporthe oryzae* que provoca el tizón en el arroz (Dean *et al.*, 2012). Esta enfermedad causa grandes pérdidas tanto en pre como en postcosecha, además de alterar la fruta en el transporte y almacenamiento (Darakshan *et al.*, 2020) ya que las condiciones propicias para su crecimiento son las lesiones, una gran cantidad de humedad, el tejido vegetal senescente y un alto contenido en azúcares (Romanazzi *et al.*, 2016).

Las **infecciones primarias suelen producirse en el momento de la floración** por parte de los conidios y conducen a una colonización del receptáculo que se vuelve inactivo, causando una pudrición agresiva al inicio de la maduración de la fruta (Weber y Hahn, 2011). **Las lesiones aparecen en el extremo del tallo del fruto** como pequeñas manchas que se agrandan a medida que pasa el tiempo y cubren toda la superficie. Las manchas se cubren con un micelio fúngico blanco con manchas grises y marrones (Darakshan *et al.*, 2020). Esta infección puede perdurar hasta la llegada al supermercado. Saleh y Al-Thani (2019) analizaron muestras frutas de distintos tipos en varios supermercados detectando *Botrytis* spp. en tomates y fresas.

Las principales pérdidas postcosecha debidas a *B. cinerea* se producen **en frutas frescas como manzana, mora, arándano, grosella, uva, kaki, kiwi, pera, granada,**

Introducción general

membrillo, frambuesa, fresa, uva, entre otras (Droby y Lichter, 2007; Romanazzi y Feliziani, 2014) (**Figura II.1**). En otras frutas, por ejemplo, albaricoque, limón, naranja, melocotón, ciruela, cereza dulce, aunque no es el patógeno principal, es frecuente su presencia (Abd-Elsalam, 2020).



Figura II.1. Desarrollo de *Botrytis* spp. en algunas frutas. De izquierda a derecha, en la primera fila: membrillo, fresa, kiwi, frambuesa. Segunda fila: kiwi baby, uvas de mesa, granada, arándano. Tercera fila: caqui, melocotón (infección a la izquierda), naranja, cereza. (Modificada de Romanazzi *et al.*, 2016)

Algunos **factores de virulencia** definidos están involucrados en diferentes fases del proceso de patogénesis de *B. cinerea*, como **quitinasas**, **poligalacturonasas**, **celulasas**, entre otras enzimas líticas y degradantes de la pared celular. Las quitinasas son necesarias para la penetración a través de la cutícula. En el caso concreto del gen *cutB* se ha podido comprobar que solo se expresaba en presencia de lípidos vegetales (Leroch *et al.*, 2013).

- Monilinia spp.

El género *Monilinia* es el causante de la **podredumbre parda**, ocasionada por las especies *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena* y *Monilinia fructicola* (Grzegorzcyk *et al.*, 2017). *Monilinia* spp. causan síntomas similares en la fruta y su identificación se complica por el hecho de que las características morfológicas como el tamaño de los conidios, el diámetro de las hifas, la formación del tubo germinativo y el color y la forma de las colonias están fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales (Abate *et al.*, 2018^a). Esta podredumbre **afecta sobre todo a las frutas de hueso** en climas cálidos y húmedos en todo el mundo, lo que provoca grandes pérdidas de productividad en el campo y en las operaciones postcosecha (Pacheco *et al.*, 2014). Por ejemplo, en melocotón o nectarina se ha detectado que puede llegar a causar un 80% de pérdidas de rendimiento en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Aiello *et al.*, 2019). Los síntomas provocados por estas especies son muy variados, incluyendo el **marchitamiento de las flores, chancros en los tejidos leñosos y la pudrición de la fruta**. Estos daños tan variados pueden ser provocados en varias partes de la planta, pueden afectar tanto a las flores, ramitas y frutos (Martini y Mari, 2014), pero el daño que más veces se suele manifestar es en la fase de postcosecha.

Monilinia laxa es el patógeno responsable de la **pudrición parda más común** y es muy ubicuo, ya que no solo se ha encontrado en melocotones y nectarina, sino también en cerezas, ciruelas, albaricoques y almendras (Rodríguez-Pires *et al.*, 2020). Aunque esta especie se le conoce como podredumbre parda europea, se ha documentado también su presencia en los demás continentes del planeta (Di Francesco y Mari, 2018). En nuestro país es la causa más importante de enfermedades de postcosecha tanto en melocotones como en nectarinas, siendo aislada entre el 10 y 15% de la fruta afectada por la podredumbre parda (Casals *et al.*, 2010). García-Benitez *et al.* (2019) reportaron que *M. laxa* tiene al menos una fitotoxina y actividad α -glucosidasa, esto hace que se considere como un moho necrotrófico ya que degrada las paredes celulares de la planta.

Monilinia fructigena también causa la **pudrición parda en frutas de pepitas y hueso**, además de provocar el tizón de las flores y las hojas (Berrie y Holb, 2014). En la manzana, que es una fruta que se suele consumir fresca, es propensa a la infección micótica por parte de *M. fructigena*, y causa importantes pérdidas durante el almacenamiento (Madbouly *et al.*, 2020). Aunque este patógeno no es exclusivo de

Introducción general

manzana, de hecho, Poniatowska *et al.* (2013) identificaron un total de 670 aislamientos de mohos de diferentes frutas, de los cuales 433 eran de *M. fructigena* (64% de los aislamientos). Concretamente identificaron *M. fructigena* en diferentes frutas como pera, membrillo, albaricoque, durazno, ciruela, cerezas y guinda.

Monilinia laxa y *M. fructigena* han sido las únicas especies presentes en Europa hasta 2001, cuando se introdujo *M. fructicola*. Esta se extendió rápidamente sobre todo por Europa occidental y central; además, se volvió prevalente respecto a las antiguas especies autóctonas (Abate *et al.*, 2018^b). Villarino *et al.* (2013) predijeron que *M. fructicola* desplazaría a *M. fructigena* (con una menor virulencia) en algunos hábitats y competiría únicamente con *M. laxa* en el ecosistema patogénico de la pudrición parda. En los años siguientes se constató este hecho, ya que hubo un cambio en la dinámica de las poblaciones silvestres de *Monilinia* spp. en los países mediterráneos como España y Grecia, ya que la introducción del ***M. fructicola* provocó el desplazamiento casi por completo al *M. fructigena* y parcial de *M. laxa*** (Papavasileiou *et al.* 2015; Villarino *et al.* 2013). *M. fructicola* crece más rápido, esporula más abundantemente y es capaz de dispersarse más eficazmente (Villarino *et al.*, 2013). Así lo constatan los informes recientes sobre la presencia de este patógeno provenientes de Italia (Pellegrino *et al.* 2009), España (De Cal *et al.* 2009), Suiza (Hilber-Bodmer *et al.* 2010), Eslovenia (Munda y Viršček Marn, 2010) y Eslovaquia (Ondejková *et al.* 2010), donde se encontró en plantaciones de árboles de frutas de hueso. ***Monilinia fructicola* causa graves tizones en flores y ramitas y podredumbre parda de la fruta de hueso, que ocasionalmente afecta a la fruta de pepita** (Vasić *et al.*, 2016), causando un deterioro y pudrición de la fruta (Poniatowska *et al.*, 2013).

- *Penicillium* spp.

Este género es uno de los más comunes que crecen en una amplia gama de hábitats, desde el suelo hasta la vegetación, pasando por ambientes interiores, aire y alimentos, pero sobre todo está **asociado a la descomposición de la fruta**. Son especies aerobias indiferentes ante las exigencias nutricionales, por lo que están adaptados a crecer en una amplia gama de entornos, como se ha mencionado antes. También se encuentran especies muy especializadas como determinadas especies patógenas de las diferentes frutas (Perrone y Susca, 2017). En la **Tabla II.1** se muestran las principales especies de *Penicillium* responsables de podredumbre en fruta. ***Penicillium* spp. no solo afecta a la**

fruta en el árbol sino también durante el almacenamiento, siendo el responsable de la mayoría de las pérdidas que se producen en frutas en este periodo de tiempo (Dukare *et al.*, 2020).

Algunas especies de este género, como son *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, son las causas más comunes de descomposición en cítricos denominadas **podredumbre verde y podredumbre azul**, respectivamente. Estas dos especies son responsables de cuantiosas pérdidas en el ámbito agroalimentario. *Penicillium italicum* junto con *P. digitatum* pueden ser responsable del **90% de las pérdidas totales en postcosecha en cítricos**, puesto que son los mohos más agresivos en este tipo de frutas, aunque su agresividad varía en función del tipo de cítrico estudiado (Louw y Korsten, 2015; Marcet-Houben *et al.*, 2012). La fruta puede ser atacada por estas especies en cualquier etapa después de la cosecha. La invasión inicialmente requiere daño en el tejido de la piel, lo que ocurre fácilmente en los sistemas modernos de manipulación a granel. La pudrición se propaga por contacto de fruta a fruta. Como era de esperar por su fisiología, el crecimiento de estas especies en los cítricos es rápido a 20-25°C, pero muy lento por debajo de 5°C o por encima de 30°C (Pitt y Hocking, 2009^b).

Introducción general

Tabla II.1. Especies de *Penicillium* asociadas a la pudrición de frutas (Modificada de Dukare *et al.*, 2020).

Especies de <i>Penicillium</i>	Enfermedad postcosecha	Vegetal diana	Referencias
<i>P. digitatum</i>	Moho verde	Frutas cítricas	Farr y Rossman, 2016a; Vilanova <i>et al.</i> , 2014
<i>P. italicum</i>	Moho azul	Frutas cítricas	Hernández-Montiel <i>et al.</i> , 2010; Niu <i>et al.</i> , 2018
<i>P. expansum</i>	Moho azul	Manzanas, peras, ciruelas, melocotones, kiwi, cereza, albaricoque, melón, fresas, moras, frutas cítricas	Pitt y Hocking, 2009b; Lugauskas <i>et al.</i> , 2005; Batta, 2006; 2007; Wang <i>et al.</i> , 2009; Vilanova <i>et al.</i> , 2012
<i>P. crustosum</i>	Moho azul	Peras y manzanas	Spotts <i>et al.</i> , 1998; Louw y Korsten, 2014
<i>P. solitum</i>	Moho azul	Peras y manzanas	Spotts <i>et al.</i> , 1998; Louw y Korsten, 2014
<i>P. glabrum</i>	Pudrición postcosecha	Fresas y granadas	Bardas <i>et al.</i> , 2009
<i>P. chrysogenum</i>	Putrefacción postcosecha	Uvas y tomates	Elhariry <i>et al.</i> , 2011
<i>P. herquei</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. mimioluteum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. sclerotiorum</i>	Pudrición postcosecha	Granada	Palou <i>et al.</i> , 2010; Spadaro <i>et al.</i> , 2010; Farr y Rossman, 2016b; Labuda <i>et al.</i> , 2004
<i>P. adametziodes</i>	Pudrición de la fruta	Granada	Quaglia <i>et al.</i> , 2016
<i>P. olsonii</i> , <i>P. solitum</i> , <i>P. polonicum</i>	Putrefacción postcosecha	Tomate	Chatterton <i>et al.</i> , 2012
<i>P. bialowiezense</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. echinulatum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. solitum</i>	Moho azul	Uvas y tomates	Kim <i>et al.</i> , 2007
<i>P. commune</i>	Pudrición de la fruta	Lichi	Lichter <i>et al.</i> , 2004
<i>P. sclerotigenum</i> , <i>P. polonicum</i>	Moho azul	Batata	Kim <i>et al.</i> , 2008

Otra de las especies relevantes de este género es *Penicillium expansum*, la cual provoca en muchas frutas y hortalizas grandes pérdidas económicas, causando la **podrición del moho azul**. La enfermedad en la fruta se va desarrollando a partir de las heridas provocadas en la piel del vegetal ocasionadas por daños físicos o biológicos provocados por pájaros e insectos (Errampalli, 2014). Estas lesiones primero se presentan de un color marrón claro, de textura blanda y acuosa. Por esta textura blanda y acuosa que le produce el moho a la fruta, se le conoce también como **podredumbre blanda**. Conforme va envejeciendo la herida, esta adquiere un color verdoso-azulado debido al crecimiento de los conidios del moho. Se ha demostrado que conforme la herida va envejeciendo, esta lesión se vuelve más resistente que las lesiones frescas. Esto es debido a un aumento de taninos, ligninas y otras sustancias de las paredes celulares adyacentes a las heridas en manzanas (Vilanova *et al.*, 2012). Los tejidos sanos se diferencian de los enfermos, ya que estos últimos tejidos pueden separarse con bastante facilidad del sano, dejando una cavidad. La presencia de masas de esporas de color azul verdoso en el área descompuesta y el olor a humedad asociado son la indicación diagnóstica positiva de moho azul, *Penicillium* spp. incluyendo *P. expansum*. Esta especie también **está asociada con dos importantes enfermedades centrales de la manzana como son el núcleo mohoso y la pudrición del núcleo** en Australia, Canadá, China, Nueva Zelanda, Sudáfrica, los Países Bajos, el Reino Unido y los EE. UU (van der Walt *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013).

Penicillium expansum, además, puede producir patulina en frutas, que es una micotoxina que fundamentalmente causa problemas gastrointestinales (Boussabbeh *et al.*, 2016; De Melo *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014). Esta micotoxina está asociada a diferentes frutas como por ejemplo **manzanas, peras, melocotones, albaricoques, uva, fresas y kiwis** (Neri *et al.* 2010; Tančinová *et al.* 2015; Reddy *et al.* 2010; Wei *et al.* 2016). El riesgo de exposición a la patulina está asociado al consumo de productos visualmente limpios, pero que estén contaminados con mohos (de Souza Sant'Ana *et al.*, 2008), debido a la acumulación de micotoxinas tanto en la lesión como en otras partes de la fruta estropeada (Wei *et al.*, 2016). El riesgo aumenta con la posible ocurrencia de esta micotoxina durante el **almacenamiento de frutas y el procesamiento de alimentos** (Sadok *et al.*, 2019; Reddy *et al.* 2010). En el año 2006, se estableció el reglamento 1881/2006 por el cual se regula el contenido máximo de determinadas micotoxinas en productos alimenticios. Este contenido máximo debe establecerse de manera estricta para

Introducción general

que pueda conseguirse razonablemente si se aplican buenas prácticas agrícolas, pesqueras y de producción, y teniendo en cuenta el riesgo relacionado con el consumo del alimento. Por ejemplo, la ingesta diaria tolerable máxima provisional es de 0,4 µg/kg peso corporal (pc) para la patulina.

- *Alternaria* spp.

Las especies de *Alternaria* son **ubicuas en el medio ambiente siendo muchas patógenas de plantas** y afectan a los cultivos en el campo causando enfermedades del tallo y las manchas de las hojas, o estropean los frutos o granos de las plantas en la etapa de postcosecha (Patriarca, 2016). Al ser ubicua, podemos encontrar diferentes patógenos de este género en alimentos de origen vegetal (Estiarte *et al.*, 2017), siendo responsables en los mismos de diferentes tipos de podredumbres (**Tabla II.2**). Tournas y Katsoudas (2005) identificaron miembros de este género en el 46% de las muestras de arándanos y el 8% de las fresas, donde aparecieron en el tallo o en áreas magulladas. Además, se detectaron en cerca del 75% de las bayas de las muestras afectadas. Este hecho está asociado a que este moho tiene un crecimiento más rápido que otros mohos alterantes como pueden ser *Rhizopus* spp. o *B. cinerea*.

La especie *A. alternata* es la **más importante del género *Alternaria* en lo que respecta a contaminación en frutas**. La forma más común de infección de *A. alternata* es a través de heridas producidas por el frío, por quemaduras solares o por el daño mecánico sufrido durante la cosecha en diversas frutas (**Tabla II.2**). Esto ocurre en tomates, arándanos, manzanas, caqui y mango, aunque en uvas de mesa en concreto se observó que penetraron a través de los estomas, lenticelas y micro fisuras que pudiera tener la epidermis, lo que permite que el patógeno ingrese al tejido inmaduro y permanezca inactivo durante semanas hasta que la fruta madure (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014). En **cítricos esta especie provoca la mancha marrón** (Sanzani *et al.*, 2016). También se han encontrado en otras frutas como pera, melón y fresas (Li *et al.*, 2007; Logrieco *et al.*, 2009).

Tabla II.2. Enfermedades que provoca *Alternaria alternata* en diversas frutas (Elaboración propia).

<i>Fruta</i>	Enfermedad	Referencia
Mango	Pudrición del extremo del tallo	Amin <i>et al.</i> , 2011
	Pudrición lateral y del extremo del tallo	Kobiler <i>et al.</i> , 2001
Manzanas Fuji	Corazón mohoso y pudrición del corazón	Gao <i>et al.</i> 2013
Manzanas	Corazón mohoso y pudrición del corazón	Harteveld <i>et al.</i> , 2013
	Mancha negra	Shtienberg, 2012
Mandarina	Pudrición negra	Nemsa <i>et al.</i> , 2012
Kiwis	Pudrición negra	Kwon <i>et al.</i> , 2011
Melones	Mancha negra	Wang <i>et al.</i> , 2010
Melocotones	Corazón mohoso y pudrición del corazón	Pose <i>et al.</i> , 2010
Mandarinas	Mancha marrón	Fourie <i>et al.</i> , 2009; Reis <i>et al.</i> , 2006
Higos	Pudrición	Doster y Michailides, 2007
Lichi	Pardeamiento del pericarpio	Sivakumar <i>et al.</i> , 2007
Pera	Manchas negras	Li <i>et al.</i> , 2007
Cítricos	Mancha marrón	Timmer <i>et al.</i> , 2000
Pomelo	Mancha marrón	Peever <i>et al.</i> , 2002

Su importancia se debe a dos factores; por un lado, provoca la llamada **mancha negra en frutas en todo el mundo** y, por otro lado, tiene la capacidad de liberar diversas **micotoxinas como son el ácido tenuazónico, alternariol, altemueno, éter monometílico del alternariol y altertoxina I, II III** (Garcha y Natt, 2012; Marin *et al.*, 2013). En relación con la salud humana, el alternariol y el éter monometílico del alternariol se han relacionado con cáncer ya que pueden aumentar la tasa de rotura en el ADN de las células de carcinoma humano al ser estimulada esta escisión del ADN por las topoisomerasas I, II α y II β (Fehr *et al.*, 2009). El ácido tenuazónico se ha relacionado con trastornos hematológicos (Patriarca, 2016).

Otras especies del género *Alternaria* destacables en frutas son *Alternaria arborescens* que causa cancro del tallo del tomate y *Alternaria gaisen* que causa la enfermedad de la mancha anular de las peras (Mamgain *et al.*, 2013).

- **Rhizopus spp.**

Un tipo de podredumbre importante en todo tipo **de frutas de hueso y bayas** es la **podredumbre de tránsito**, llamada así porque generalmente se desarrolla en la fruta en cajas durante el transporte (Anwer, 2015). La pudrición de *Rhizopus* es causada por las especies *R. stolonifer* y *R. oryzae*. Sus esporas son muy comunes en la atmósfera. En el caso de melocotones se ha podido comprobar que la infección ocurre principalmente

Introducción general

en los sitios de las heridas durante la cosecha, el empaquetamiento o durante el transporte (Xu *et al.*, 2013^a).

La **podrición blanda** comienza en una sola fruta, que luego se ve rodeada por un "nido" grueso y suelto de micelio. El crecimiento se propaga rápidamente, envolviendo varias frutas adyacentes a la originalmente infectada y, a veces, toda la fruta en una caja, en solo 2 a 3 días. Esta forma de crecimiento es característica, y los esporangios que son blancos cuando son jóvenes, pero se oscurecen a medida que maduran (Pitt y Hocking, 2009^c). El patógeno se distribuye ampliamente en el suelo y la atmósfera, además que este moho necesita de un ambiente cálido y húmedo, como se ha dicho anteriormente necesita que haya tejido dañado para poder infectar la fruta, y una vez infectada el área enferma aparece empapada de agua a través de la piel distendida (Oktarina *et al.*, 2012).

- **Fusarium spp.**

Este género causa enfermedades en diferentes partes de las plantas que pueden incluir pudriciones de raíces, tallos, frutos o semillas, enfermedades de las hojas, cánceres y marchiteces (Leslie y Summerell, 2006). La infección por *Fusarium* spp. se puede presentar de diferentes formas atendiendo a los síntomas, y el desarrollo de la enfermedad en el interior de la fruta puede denominarse **pudriciones del núcleo mohosas, húmedas o secas** (Jijakli y Lepoivre, 2004; Maxin *et al.*, 2012).

Fusarium spp. afecta principalmente a los cereales y productos derivados, donde las micotoxinas producidas por especies de este género son un problema (Mielniczuk y Skwarylo-Bednarz, 2020). Sin embargo, también se han encontrado en diferentes tipos de frutas, por ejemplo, en cultivos de **banana** (Pocasangre *et al.*, 2000), en **uvas** de vino (Al-hindi, *et al.*, 2011), cítricos (Tournas y Katsoudas (2005), entre otras frutas. En concreto, Tournas y Katsoudas (2005) encontraron que *Fusarium* spp. fue uno de los géneros más comunes aislados de cítricos. Concretamente ***Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*** han sido las especies asociadas a podredumbres **en cítricos** (Smilanick *et al.*, 2019). En **manzanas y peras**, las especies aisladas más comunes implicadas en su deterioro son *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium lateritium* y *Fusarium solani* (Sever *et al.*, 2012), donde producen una necrosis circular marrón, blanda y acuosa, que se extiende gradualmente sobre el

tejido infectado, que se hunde ligeramente, a veces con un micelio blanquecino denso (Trkulja, 2008).

- **Geotrichum spp.**

Solamente dos especies de este moho levaduriforme son conocidas por afectar a los alimentos; concretamente las especies *Geotrichum candidum* y *Geotrichum citri-aurantii*, las cuales producen la **podredumbre agria en cítricos** (Pitt y Hocking, 2009^d). Sus lesiones son suaves, gelatinosas, penetran profundamente en la fruta y no alteran el color del tejido infectado, por tanto, son difíciles de detectar (Smilanick *et al.*, 2020). También es un buen indicador de higiene en la industria ya que si los equipos no tienen una buena limpieza puede contaminar las frutas (Darakshan *et al.*, 2020). *Geotrichum candidum* es causante de grandes pérdidas económicas durante la postcosecha en cítricos y además causa problemas durante el manejo, el transporte y el almacenamiento (Talibi *et al.*, 2014).

La especie *G. citri-aurantii* (**Figura II.2**) es capaz de colonizar la fruta y desarrollar enfermedades introduciéndose a través de heridas ocurridas antes de la cosecha, especialmente por contaminación de partículas del suelo que por el aire se depositan en la superficie de la fruta, por salpicaduras de agua o por que los utensilios de cosecha estén sucios (Soto-Muñoz *et al.*, 2020). También se han detectado estos mohos contaminantes en el lichi (Liu *et al.*, 2022).

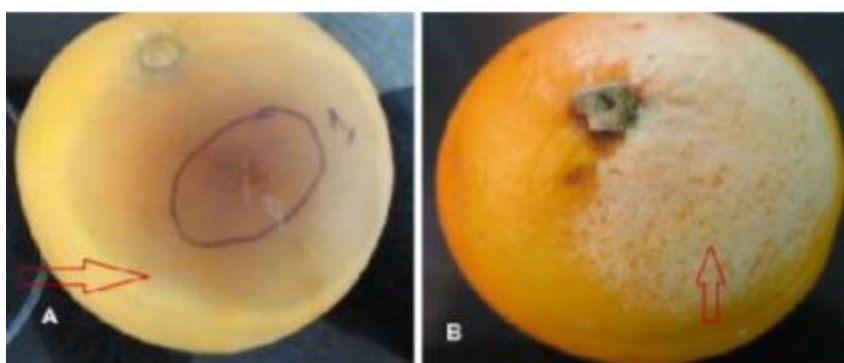


Figura II.2. Deterioro en frutas cítricas causado por *Geotrichum citri-aurantii*. A: síntomas de podredumbre agria (flecha) y B: Crecimiento fúngico tras varios días de la inoculación (Nazerian y Alian, 2013).

Introducción general

II.1.1.3 Frutos secos

Son frutos de una sola semilla, que debido a su larga vida útil por su baja a_w pueden ser una buena alternativa a las frutas frescas, sobre todo en la temporada de invierno (Waheed y Siddique, 2009). Los frutos secos incluyen almendras, avellanas, pistachos, nueces de Brasil, nueces, cocos y nueces de macadamia.

Los frutos secos son muy susceptibles al deterioro debido a que su contenido de carbohidratos solubles es bajo, por lo que **cualquier aumento en el contenido de humedad provoca un aumento apreciable de la a_w** (Roberts *et al.*, 2005), fomentando el crecimiento de varios microorganismos, incluidas las especies de **hongos toxigénicos**. La presencia de los mohos en los frutos secos conlleva la descomposición de estos, pudiéndose acelerar por la actividad enzimática del moho, que altera la apariencia, la textura, el sabor y la calidad general del fruto seco y, en última instancia, acorta la vida útil (Pinkas *et al.*, 2009).

Entre las diversas especies asociadas a frutos secos destacan la presencia de especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Por ejemplo, en nueces se ha reportado la presencia de *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Penicillium* (Bayman *et al.*, 2002). En este mismo fruto seco e higos en el estado de California (EUA), se identificaron como dominantes diferentes especies de *Aspergillus* fueron, como son *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus* y *Aspergillus alliaceus* (Molyneux *et al.*, 2007). Más recientemente, Tournas *et al.* (2015) identificaron 117 aislados de moho potencialmente toxigénicos de frutos secos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Fusarium*, y *Alternaria*. Igualmente, Al Ghamdi *et al.* (2019) encontraron que *Aspergillus* era el género dominante seguido por *Rhizopus* y *Penicillium* en diferentes frutos secos y productos derivados en la provincia de Jeddah (Arabia Saudí). Resultados similares fueron encontrados por Abbas *et al.* (2019) en el estudio de la población fúngica de una amplia variedad de frutos secos (nuez, almendra, semilla de albaricoque, anacardo, coco, piñón, pistacho, ciruelas pasas, dátiles secos, higo, morera y pasas). Concretamente, los géneros dominantes fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Candida* spp. siendo las especies fúngicas predominantes aisladas fueron *Aspergillus niger* (25,8%), y *Aspergillus flavus* (19,3%), seguido de *Aspergillus fumigatus* (11,8%). Alhussaini (2012) en diferentes frutos también reportó como dominantes las especies *A. niger* y *A. flavus*. Por lo tanto, entre los mohos más comúnmente identificados en este tipo de productos, destaca por su carácter

toxigénico la presencia de especies del género *Aspergillus*. Su crecimiento en los alimentos y su ingestión puede llevar a desarrollar muchos problemas relacionados con la salud, como micosis, que pueden variar desde afecciones clínicas leves a potencialmente mortales, particularmente en pacientes inmunodeprimidos (Abbas *et al.*, 2019). Se sabe que *Aspergillus* sección *Flavi* (*A. flavus*, *Aspergillus parasiticus*, y *Aspergillus nomius*) producen compuestos tóxicos y carcinogénicos, concretamente, entre otras sustancias, **son productoras de aflatoxinas** (Iqbal *et al.*, 2014). Entre ellas, la aflatoxina B1 (AFB1) está reconocida como uno de los carcinógenos más potentes y ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2020) en el grupo 1A. Otras de las especies de *Aspergillus* dominantes son los *Aspergillus* sección *Nigri*, los cuales son capaces de producir **145 metabolitos que se consideran tóxicos** para humanos y animales (Perrone y Gallo, 2017). Entre ellos destaca la producción de ocratoxina A, clasificada por la IARC en el grupo 2B, y que suele ser asociada a *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* y *A. ochraceus* (Čolović *et al.*, 2019; El Khoury y Atoui *et al.* 2010).

II.1.1.4 Cereales

Los cereales y los productos a base de cereales son fuentes importantes de alimento para los seres humanos en todo el mundo. Los cereales se utilizan como materias primas o ingredientes para la preparación de muchos alimentos en la mayoría de las culturas dado que los cereales incluyen una rica fuente de nutrientes como vitaminas, minerales, carbohidratos, grasas, aceites y proteínas (Bullerman y Bianchini, 2009). Los cereales más abundantes en el mundo son trigo, cebada, arroz, maíz, mijo, sorgo, centeno y avena (Oliveira *et al.*, 2014). Desde mediados de la década de 1960, el mundo pudo aumentar la producción de cereales en casi mil millones de toneladas. Con el fin de mantener el ritmo de crecimiento de la población durante los próximos 30 años, debe hacerlo de nuevo (FAO, 2002). Para garantizar ese crecimiento, es importante garantizar la microbiología y la seguridad de los granos de cereales durante el cultivo, la cosecha, el almacenamiento, el transporte y el procesamiento.

Las infecciones por hongos causan varias enfermedades de las plantas, reducen el rendimiento, provocan decoloración, marchitamiento de los granos y reducen la cantidad y calidad de los granos (Osborne y Stein, 2007; Schwarz *et al.*, 2001). Los granos de cereales están expuestos a contaminaciones en el campo a través de varias fuentes como

Introducción general

el agua, estiércol compostado, suelo, etc. durante el cultivo y la cosecha; y posteriormente pueden ser contaminados durante el almacenamiento y el transporte (Oliveira *et al.*, 2014). Estos hongos causan distintas enfermedades en los **granos de cereal** como "ojos azules" relacionada con la presencia de *Penicillium* y especies de *Aspergillus* (Bullerman y Bianchini, 2009), donde el parámetro más importante para la germinación del moho es el a_w mínima de 0,68 (14% de humedad) (Laca *et al.*, 2006; Laitila *et al.*, 2007; Noots *et al.*, 1999). **Granos con alto contenido de humedad** presentan condiciones óptimas para la germinación de algunos mohos como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Helminthosporium* (Erten *et al.*, 2019). Entre las especies de *Alternaria*, se han encontrado en trigo *Alternaria helianthicola*, *Alternaria hungarica* y *Alternaria infectoria* (Mamgain *et al.*, 2013). Las especies más comunes de *Eurotium* que podemos encontrar en cereales son *Eurotium chevalieri*, *Eurotium repens*, *Eurotium rubrum* y *Eurotium amstelodami* (Hocking, 2006). En cuanto *Aspergillus*, las especies más comunes son *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus ochraceus* y *A. flavus* (Bullerman y Bianchini 2009). En relación con *Fusarium* spp., se han aislado varias especies que causan la pudrición de la mazorca de maíz, tanto en campo como en el almacenamiento (Bottalico y Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002). Las principales son *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium graminearum*, esta última causa además el **tizón de la espiga en trigo** (Ferruz *et al.*, 2016). Las infecciones por *Fusarium* spp., causa síntomas como pérdida de rendimiento de grano, reducción de rodales y pudrición de semillas, plántulas, raíces, coronas, subcoronas y tejidos del tallo inferior, y también se asocia con la cabeza blanca o la muerte prematura del trigo (Moya, 2013). ***Fusarium* spp. causan enfermedades de las plantas y producen varias micotoxinas importantes**, pero no son organismos de descomposición importantes. Sin embargo, sus micotoxinas pueden estar presentes en los granos cosechados y representar un riesgo para la salud (Sahu y Bala, 2017).

Es por ello por lo que además de las posibles alteraciones que causan los hongos filamentosos, algunas especies representan una de las principales preocupaciones de seguridad debido a la producción de micotoxinas acumuladas en los granos antes y después de la cosecha, que se asocian con graves problemas de salud (Oliveira *et al.*, 2014). Las micotoxinas representan un peligro sustancial para la salud de las industrias de elaboración de cerveza, cereales para el desayuno y panadería (Araguás *et al.*, 2005). Las diferentes **micotoxinas** que frecuentemente se encuentran en cereales son aflatoxinas,

toxinas de *Fusarium* (desoxinivalenol, las toxinas T-2 y HT-2, las fumonisinas y la zearalenona), ocratoxinas y patulina (Glenn, 2007; Codex Alimentarius, 2011; Dalié *et al.*, 2010). Además, también son destacables las toxinas de *Alternaria* y los grupos alcaloides del cornezuelo de centeno como contaminantes comunes de los cereales (Pleadin *et al.*, 2012; Roscoe *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2013; Tralamazza *et al.*, 2018). Se ha observado una alta incidencia de contaminación por micotoxinas en todo el mundo, en diferentes cultivos (Manthey *et al.*, 2004; Warzecha *et al.*, 2011). El contenido en estos contaminantes es dependiente de la infección fúngica del grano tanto como del proceso de transformación del cereal (Laca *et al.*, 2006). Según datos globales de los últimos 10 años, las incidencias y niveles máximos en granos de cereales crudos fueron **55% de aflatoxinas, 29% de ocratoxina A, 61% de fumonisinas, 58% de desoxinivalenol, y 46% y de zearalenona** (Lee y Ryu, 2017)

II.1.1.5 Especies

La Organización Internacional de Normalización (ISO) define las especias como “productos vegetales o mezclas de estos, libres de materias extrañas, utilizados para aromatizar, condimentar e impartir aroma a los alimentos” (ISO, 1995). La clasificación convencional de las especias se basa en su intensidad de sabor: especias fuertes (pimienta, chile, jengibre), especias suaves (pimentón, cilantro), especias aromáticas (canela, cúrcuma, clavo, comino, anís, apio), hierbas secas (albahaca, laurel, eneldo, mejorana, estragón, tomillo) y vegetales aromáticos (cebolla, ajo) (Peter y Babu., 2012).

Además de estas categorías, también hay mezclas de especias y mezclas de hierbas. Muchas especias se cultivan y, especialmente, se recolectan y procesan en malas condiciones sanitarias. La mayoría de los **procesos de secado se realizan directamente en el suelo** (Mathot *et al.*, 2021), esto hace que se produzca contaminación fúngica con esporas transportadas por el aire o con insectos y aves en el campo (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2015; Mandeel, 2005). Además, puede incrementar el riesgo de contaminación por el aumento de estrés por falta de agua, por efecto contrario debido a lluvias excesivas y la manipulación (Santos *et al.*, 2008). También **en el proceso de contaminación se debe considerar el almacenamiento, el envasado y el transporte** (Casquete *et al.*, 2017). Esto hace que, aunque se consuman en pequeñas cantidades, representan un importante vector de contaminación fúngica (Romagnoli *et al.* 2007; Gnonlonfin *et al.* 2013).

Introducción general

Las especies de *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium* son a menudo la **microbiota dominante de las especias secas, enteras o molidas** (Gherbawy y Shebany, 2018). Martín *et al.* (2005) caracterizaron la población fúngica de pimentón (que se produce por deshidratación de los pimientos, *Capsicum annuum*), destacando que el género *Aspergillus*, seguido de *Cladosporium* y *Penicillium* spp. comprendían la población fúngica dominante. En concreto, las especies predominantes fueron *A. niger*, *Fusarium verticillioides*, *A. expansum*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium citrinum*. Algunas de estas cepas fueron capaces de sintetizar micotoxinas como patulina, citrinitina y ácido ciclopiazónico. Resultados similares se observaron en el trabajo de Casquete *et al.* (2017), en el que se identificaron un total de 67 aislamientos procedentes de pimentón, en los cuales, *Penicillium* fue el género más común seguido de *Aspergillus*, aunque también encontraron otras especies de mohos de los géneros ***Fusarium* o *Alternaria***. Resultados similares a los obtenidos por Ruiz-Moyano *et al.* (2009) en este mismo producto y en el cual los principales mohos encontrados pertenecían a ***Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* y *Phlebia***. En ambos estudios se detectaron especies productoras de micotoxinas como *P. expansum*, *Penicillium thomii*, *Penicillium raistrickii*, *Penicillium griseofulvum*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *F. verticillioides*. En relación con la población fúngica del pimentón, las principales toxinas asociadas a este producto en estudios realizados entre 2015 y 2020 son aflatoxinas con una incidencia moderada (hasta un 50%), OTA y toxinas de *Fusarium* spp. (fumonisinas, tricotecenos y zearalenona) con una incidencia moderada o incluso alta (hasta un 75%), dependiendo de la toxina, y toxinas de *Alternaria* spp. con una incidencia baja, inferior al 25% (Pickova *et al.*, 2020).

En otras especias, al igual que en el pimentón, las principales especies de mohos contaminantes pertenecen a géneros xerófilos como *Aspergillus* y *Penicillium*, aunque también son destacable la presencia de *Fusarium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Alternaria*. A nivel de especie *A. flavus* y *A. niger* son las especies dominantes, seguidas de *A. ochraceus* y *P. citrinum* (Pickova *et al.*, 2020; Syamilah *et al.*, 2022). Así, las **principales micotoxinas detectados en estos productos son aflatoxinas y OTA**, las cuales son también las más frecuentemente analizadas (Pickova *et al.*, 2020). Jalili *et al.* (2010) analizaron la presencia de micotoxinas en pimienta negra y blanca (en polvo y en semilla). Un 47,5% de las muestras estaban contaminadas por OTA. De manera análoga Nguegwouo *et al.* (2018) encontraron OTA en un 10% de pimienta blanca y un 40% de

las muestras de pimienta negra. En un estudio de diversas especies en Chile, concretamente se analizaron muestras de canela, anís, hinojo, curry en polvo, comino, jengibre, alcaravea, hinojo, cilantro, cúrcuma, semillas de carambola y mezclas de especias se detectaron tanto aflatoxinas como OTA (Ainiza, *et al.*, 2015; Akpo-Djènontin, *et al.*, 2018; Asghar *et al.*, 2016; García *et al.*, 2018; Iqbal *et al.*, 2010; 2017; Kong *et al.*, 2013; 2014; Lippolis *et al.*, 2017; Ozbey y Kabak, 2012; Thanushree *et al.*, 2019; Tonti *et al.*, 2017; Zaied *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013^a; Zhao *et al.*, 2013^b 2014).

II.1.2 Alteración fúngica de alimentos de origen animal

Las matrices alimentarias de los diferentes productos de origen animal son muy diferentes. Por lo tanto, para el análisis de los alterantes fúngicos es necesario hacer una división en tres grandes grupos: productos cárnicos, productos derivados de la pesca y productos lácteos.

II.1.2.1 Productos cárnicos; productos curados, salazones y fermentados

Los mohos tienen un papel importante en el desarrollo de la textura, el sabor y la calidad sensorial de los productos cárnicos. Sus enzimas participan en la proteólisis, degradación de aminoácidos, lipólisis, β -oxidación y oxidación de lactato (Martín-Sánchez *et al.*, 2011). Además, estos microorganismos también contribuyen a retardar el enranciamiento y estabilizar el color al impedir la penetración de oxígeno y luz, a través de la actividad de la enzima catalasa (Bruna *et al.*, 2001). Los **mohos considerados beneficiosos que crecen en productos cárnicos madurados suelen englobarse en el género *Penicillium***. En general, las principales especies beneficiosas son *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium solitum* y la especie recientemente identificada *Penicillium salami* (Perrone *et al.*, 2015, 2019; Copetti, 2019). Las cepas de *Penicillium nordicum* han evolucionado para tener una tolerancia significativa a las concentraciones relativamente altas de sal utilizadas en el proceso de curado (Rodríguez *et al.*, 2015).

En los productos cárnicos curados, durante la mayor parte de la maduración el género *Penicillium* es el dominante (Castellari *et al.*, 2010), sin embargo, ***Aspergillus* y *Eurotium* spp. puede volverse dominante en productos con procesos largos de maduración**, sobre todo cuando se incrementan la temperatura y disminuye la a_w (Comi y Iacumin, 2013), proliferando especies de estos géneros debido a su carácter xerófilo

Introducción general

(Ortiz-Lemus *et al.*, 2021). **Otros géneros se han encontrado menos frecuentemente como pueden ser *Mucor*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis*, *Geotrichum* y *Alternaria*** (Iacumin *et al.*, 2009).

Sin embargo, no todos los mohos contribuyen positivamente a la maduración, algunas especies o cepas de mohos pueden producir efectos indeseables en la calidad de estos productos, ocasionando sabores y aspectos desagradables (Ludemann *et al.*, 2010). Uno de estos aspectos desagradables es la **formación de manchas negras** en embutidos fermentados crudos curados por *Cladosporium oxysporum* (Lozano-Ojalvo *et al.*, 2015; **(Figura II.3)** o en jamón curado por *C. oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum* (Alía *et al.*, 2016). Otras alteraciones son las causadas por *Chrysosporium pannorum* que provoca **manchas blancas en la carne congelada**, mientras que *P. expansum* es responsable de la aparición de **manchas azul-verdosas** en la carne, mientras que *Thamnidium elegans*, *Mucor racemosus* y *C. herbarum* puede producir **alteraciones en carne congelada** (Odeyemi *et al.*, 2020). Además, el crecimiento de los mohos en la superficie de la carne y productos cárnicos curados puede conllevar la producción de antibióticos y micotoxinas. Este hecho puede comprometer la calidad del producto, no solo en las características sensoriales, sino también por un problema para la seguridad alimentaria debido a la presencia de especies toxigénicas principalmente **productoras de OTA como *P. nordicum*, *Penicillium verrucosum*, *P. nalgiovense*, *Aspergillus westerdijkiae* y *A. ochraceus***, (Malir *et al.*, 2016; Perrone *et al.*, 2019). Estos mohos son los principales responsables de la contaminación por micotoxinas en estos productos cárnicos. Aunque otras especies micotoxigénicas también pueden ser detectadas, por ejemplo, Cence *et al.* (2019), identificaron en la superficie de salami *Penicillium simplicissimum*, *A. niger complex*, *P. nalgiovense* y *A. flavus*. En jamón curado, en un estudio realizado por Martín *et al.*, (2004), dio como resultado que el 50% de 20 cepas aisladas de productos cárnicos curados eran potencialmente productores de micotoxinas. Así, además de OTA, aflatoxinas han sido detectadas en salami en España y Egipto (Montanha *et al.*, 2018).

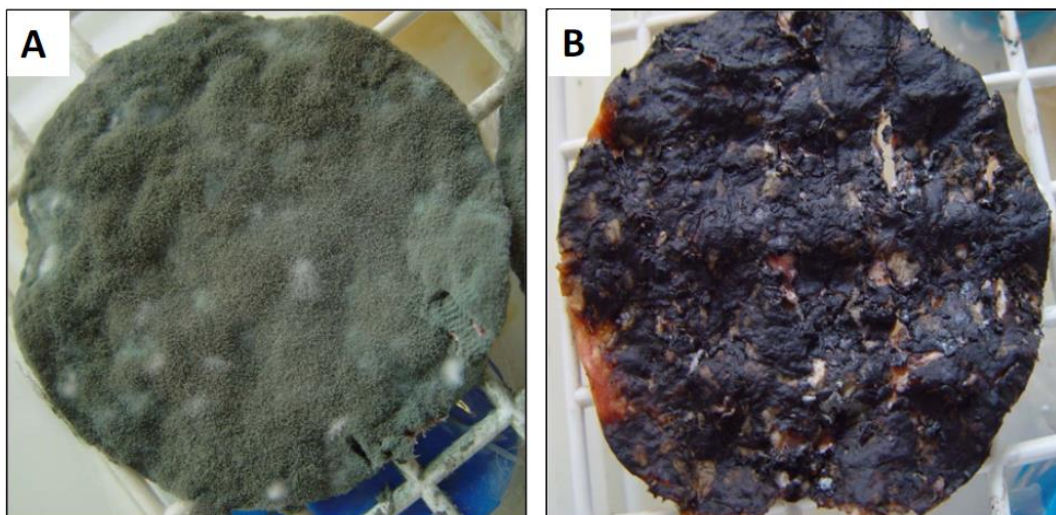


Figura II.3. Alteración de las manchas negras causadas por la especie *Cladosporium oxysporum* en salchichón. (A) Rebanada de "salchichón" con crecimiento de hongos después de 20 días de incubación. (B) Rebanada de "salchichón" después de 20 días de incubación que muestra ennegrecimiento en la parte inferior después de raspar el crecimiento de micelio de moho de la superficie. Extraído de Lozano-Ojalvo *et al.* (2015).

II.1.2.2 Productos derivados de la pesca: salazones y fermentados

El pescado y los productos del mar son, junto con la carne, las mayores fuentes proteínicas de la nutrición humana. Además, son buenas fuentes de ácidos grasos poliinsaturados, minerales esenciales y vitaminas (Tacon y Metian 2017; Zang *et al.*, 2018). El crecimiento de mohos en productos de pescado desecado causa deterioro, decoloración, pudrición y también alteraciones en la calidad del sabor y la textura del pescado seco, que resulta en una pérdida de la calidad de nutrientes terminando en una enorme pérdida económica (Sivaraman *et al.*, 2015).

Se han aislado varios hongos filamentosos de pescado en salazón en mal estado (Pitt y Hocking, 2009^e). Las especies de mohos aislados de pescados en salazón se diferencian en función de tipo de clima; por ejemplo, en climas templados la especie predominante es *Wallemia sebi*, y en clima subtropical *Hortaea werneckii* (Gram, 2009). El moho *Wallemia sebi* es un hongo xerófilo que causa deterioro en los pescados sazonados de color pardo por el crecimiento de las colonias marrones de este moho (Gram, 2009). Puesto que son pescados sazonados, los mohos que crecen en su superficie serán mohos halófilos como *Eurotium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Aspergillus spp.* (Comi, 2017). De este último género, las especies identificadas han sido *A. flavus*, *A.*

Introducción general

niger y *Aspergillus fumigatus*, además de especies de *Rhizopus* y de *Mucor* (Logesh *et al.*, 2011). Estos mohos xerófilos llegan al pescado a través de los aditivos, especialmente la sal (Ismail, 2013).

Con respecto a los pescados ahumados, en el estudio de Ike *et al.* (2020) se identificaron *A. niger* y algunas especies de *Mucor*, en un total de 25 muestras diferentes de pescados ahumados. ***Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más comunes asociados al pescado ahumado** (Wogu y Iyayi., 2011). *Mucor* se suele encontrar más en el suelo, las plantas, el estiércol, las frutas en descomposición, y es un contaminante de los alimentos almacenados y procesados. En el ensayo de Fasuan *et al.* (2021) identificaron una mayor diversidad de especies de *Aspergillus*, incluyendo *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, además de otras cepas de *Aspergillus* no clasificadas y algunas especies de *Penicillium*.

II.1.2.3 Productos lácteos fermentados: queso

Entre los productos alimenticios, los productos lácteos fermentados son susceptibles de deterioro debido al crecimiento de hongos, que son resistentes a pH bajos y pueden proliferar a bajas temperaturas de almacenamiento (Seol *et al.*, 2019). Este es el caso de algunas levaduras, que no solo crecen a bajas temperaturas, sino que necesitan bajas temperaturas para sobrevivir (Fröhlich-Wyde *et al.*, 2019). Aunque por el contrario hay levaduras que necesitan temperaturas más altas de lo normal, como le ocurre a *Yarrowia lipolytica*, que necesita unos 32°C para un crecimiento óptimo (Fleet, 2011). Además, esta levadura, al crecer en quesos tiene una gran actividad lipolítica y proteolítica y esta actividad en **presencia de tirosina**, produce una de las alteraciones más conocidas en quesos de pasta blanda, como es la **decoloración marrón** (Carreira *et al.*, 2001). Los defectos causados por las levaduras pueden **incluir formaciones de ojos y producción de gas**, coloración marrón o la piel de sapo. Esta última alteración, la **piel de sapo**, es producida por una levadura que se comporta como moho, llamada *G. candidum* (Biango-Daniels y Wolfe, 2021). Además, esta levadura puede producir otro defecto en quesos, como puede ser el **desprendimiento de la corteza**, en el que la corteza se separa de la parte interior del queso (Wolfe, 2016). La formación de ojos en los quesos es producida por la producción de gas por las levaduras fermentativas al consumir la lactosa presente en los quesos, suelen estar producidas por levaduras de la especie *Kluyveromyces*. Concretamente la especie *Kluyveromyces marxianus* destaca en esta

alteración en algunas variedades de queso, aunque este tipo de alteración también puede ser producido por otras especies como son *Kluyveromices lactis*, *Dekkera anomala* o *Torulaspota delbrueckii* (Bintsis, 2021; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). Aunque en quesos azules este tipo de formaciones no se consideran alteración, ya que se espera que en este tipo de quesos aparezcan este tipo de cavidades (Fleet, 2001). Otro tipo de defecto puede ser la aparición de sabores y olores extraños, estos pueden ser producido por la acumulación de determinados compuestos que pueden asociarse al deterioro o la contaminación.

Por otro lado, los mohos también producen alteraciones en los quesos, al ser la maduración de los quesos a bajas temperaturas, el deterioro es generalmente asociado a mohos psicrotolerantes, y además es posible que puedan crecer en condiciones de oxígeno relativamente bajo, ya que suelen aparecer en envases al vacío o con atmósfera modificada (Pitt y Hocking, 2009^e). En quesos el deterioro puede observarse a simple vista como los **defectos de “piel de sapo” o el “pelo de gato” causados por *G. candidum* y *Mucor spp.*, respectivamente**. Aunque también pueden ser efectos no visibles a través del metabolismo de los hongos, como la producción de olores o sabores extraños, o incluso producción de gas o alteración de la textura (Ledenbach y Marshall, 2010). Además, hay **otras especies responsables del deterioro de los quesos que pertenecen a una amplia diversidad de géneros**, como, por ejemplo, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Lecanicillium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y otros tal y como muestra la **Tabla II.3** (Garnier *et al.*, 2017^a). Entre los géneros de mohos más comunes que podemos encontrar en quesos **destacan *Penicillium* y *Aspergillus*** (Kure y Skaar, 2019).

Introducción general

Tabla II.3. Diversidad de hongos filamentosos causantes de alteración aislados de productos lácteos fermentados contaminados (Garnier *et al.*, 2017^a).

Género	Productos	Referencias
<i>Acremonium</i>	Queso de oveja, cabra y búfalo	Montagna <i>et al.</i> , 2004
<i>Alternaria</i>	Queso veta azul, queso madurado con moho, queso duro o semiduro	Kikoku <i>et al.</i> , 2008; Kure y Skaar, 2019
<i>Aspergillus</i>	Queso de oveja, cabra y búfalo, duro y semiduro, de veta azul, semiblando, queso madurado con moho y yogurt	Aran y Eke, 1987; Bullerman y Olivigni, 1974; Filtenborg <i>et al.</i> , 1996; Hassanin, 1993; Hocking y Faedo., 1992; Jodral <i>et al.</i> , 1993; Kikoku <i>et al.</i> , 2008; Kure <i>et al.</i> , 2001; Kure y Skaar, 2019; Lund <i>et al.</i> , 1995; Montagna <i>et al.</i> , 2004; Pitt y Hocking, 2009e
<i>Bipolaris</i>	Queso de veta azul	Kikoku <i>et al.</i> , 2008
<i>Botrytis</i>	Queso duro o semiduro	Hocking y Faedo, 1992
<i>Cladosporium</i>	Mantequilla y margarina, queso veta azul, de oveja, cabra y búfalo, queso madurado con moho duro o semiduro	Bullerman y Olivigni, 1974; Garnier <i>et al.</i> , 2017b; Hocking y Faedo., 1992; Kikoku <i>et al.</i> , 2008; Kure <i>et al.</i> , 2001; Kure y Skaar, 2019; Lund <i>et al.</i> , 1995; Montagna <i>et al.</i> , 2004; Pitt y Hocking, 2009e
<i>Didymella</i>	Queso fresco sin madurar y otros productos lácteos	Garnier <i>et al.</i> , 2017b
<i>Epicoccum</i>	Queso duro o semiduro	Garnier <i>et al.</i> , 2017b
<i>Eurotium</i>	Queso duro y semiduro	Aran y Eke, 1987; Kure <i>et al.</i> , 2001;
<i>Exophiala</i>	Queso tipo crema	Garnier <i>et al.</i> , 2017b
<i>Fusarium</i>	Queso de oveja, cabra y búfalo, duro y semiduro, semiblando	Bullerman y Olivigni, 1974; Hassanin, 1993; Hocking y Faedo., 1992; Jodral <i>et al.</i> , 1993; Lund <i>et al.</i> , 1995; Montagna <i>et al.</i> , 2004; Pitt y Hocking, 2009e
<i>Gliocladium</i>	Queso duro o semiduro	Hocking y Faedo., 1992
<i>Lecanicillium</i>	Queso semiblando, semiduro y duro	Lund <i>et al.</i> , 1995
<i>Naumovia</i>	Queso de pasta blanda	Westall <i>et al.</i> , 1998
<i>Penicillium</i>	Margarina y mantequilla, queso duro o semiduro, fresco sin madurar, de oveja, cabra y búfalo, semiblando y madurado con moho, yogurt y otros productos lácteos	Aran y Eke, 1987; Basílico <i>et al.</i> , 2001; Bernardi <i>et al.</i> , 2021; Bullerman y Olivigni, 1974; Filtenborg <i>et al.</i> , 1996; Garnier <i>et al.</i> , 2017b; Hassanin, 1993; Hocking y Faedo., 1992; Jodral <i>et al.</i> , 1993; Kikoku <i>et al.</i> , 2008; Kure <i>et al.</i> , 2001; Kure y Skaar, 2019; Lund <i>et al.</i> , 1995; Martin <i>et al.</i> , 2021; Montagna <i>et al.</i> , 2004; Pitt y Hocking, 2009e; Ramos-Pereira <i>et al.</i> , 2019
<i>Phaeramularia</i>	Queso duro o semiduro	Hocking y Faedo., 1992
<i>Phoma</i>	Queso duro o semiduro	Basílico <i>et al.</i> , 2001; Hocking y Faedo., 1992; Kure <i>et al.</i> , 2001; Kure y Skaar, 2019; Montagna <i>et al.</i> , 2004; Pitt y Hocking, 2009e
<i>Rhinochadiella</i>	Queso de veta azul	Kikoku <i>et al.</i> , 2008
<i>Sarocladium</i>	Queso duro o semiduro	Kure y Skaar, 2019
<i>Scopulariopsis</i>	Queso de oveja, cabra y búfalo, duro y semiduro y semiblando	Filtenborg <i>et al.</i> , 1996; Hassanin, 1993; Hocking y Faedo., 1992; Lund <i>et al.</i> , 1995; Minervini <i>et al.</i> , 2001; Montagna <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma</i>	Queso duro o semiduro	Kure <i>et al.</i> , 2001
<i>Ulocladium</i>	Queso duro o semiduro	Kure y Skaar, 2000
<i>Mucor</i>	Queso duro y semiduro, de oveja, cabra y búfalo, queso madurado con moho, semiblando y yogurt	Aran y Eke, 1987; Basílico <i>et al.</i> , 2001; Garnier <i>et al.</i> , 2017b; Kikoku <i>et al.</i> , 2008; Kure <i>et al.</i> , 2001; Kure y Skaar, 2019; Lund <i>et al.</i> , 1995; Montagna <i>et al.</i> , 2004; Pitt y Hocking, 2009e
<i>Rhizopus</i>	Queso de veta azul, de oveja, queso madurado con moho, cabra y búfalo	Kikoku <i>et al.</i> , 2008; Kure y Skaar, 2019; Montagna <i>et al.</i> , 2004
<i>Thamnidium</i>	Queso duro y semiduro	Garnier <i>et al.</i> , 2017b

Como se puede observar en la **Tabla II.3, la población micótica en los productos lácteos ya sean frescos, fermentados o madurados es muy variada.** En primer lugar, se puede apreciar que en los distintos tipos de quesos no predomina un género concreto, ya que se pueden encontrar mohos como *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., o *Fusarium* spp. entre otras. En queso Cheddar, el crecimiento del moho puede provocar durante la maduración un defecto conocido como hilo de moho (Pitt y Hocking, 2009e). En queso rallado, por ejemplo, el moho más frecuente en Sudáfrica. fue *P. solitum*, responsable de su alteración. Este tipo de deterioro se pudo controlar mediante el envasado en atmosfera modificada en 73% CO₂ y 27% N₂ (Oyugi y Buys, 2007). En Europa por el contrario el **moho más común asociado al deterioro de quesos es *Penicillium commune*, junto con *P. verrucosum* y *P. solitum*** (Lund et., 1995). Concretamente en España, el género *Penicillium* es el más común. En un 63% de las muestras se encontraron tres especies predominante *P. brevicompactum*, *P. granulatum* y *P. verrucosum* (Montagna et al., 2004; Pintado et al., 2010). Además, se pueden encontrar otros géneros como *Mucor* spp. (27% de las muestras), *G. candidum* (17%) y *C. herbarum* (10%) (Barrios et al., 1998). Resultados similares se han encontrado en queso de leche de cabra en Italia, identificando especies como *P. commune*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum* y *P. brevicompactum*. También en este tipo de quesos se han encontrado especies de *Geotrichum*, *Aspergillus* y *Mucor* (Montagna et al., 2004). En quesos turcos, *Penicillium* es el género más identificado, con representantes como *P. commune*, *P. roqueforti* y *P. verrucosum* en más del 70% de las muestras analizadas (Hayaloglu y Kirbag, 2007). En un estudio similar en Argentina, *Phoma glomerata* fue la principal causa de deterioro en quesos. Otras especies que se han encontrado son *P. commune*, *P. glabrum*, *Mucor hiemalis*, *G. candidum* (Basílico et al., 2001).

Los mohos tienen un papel importante en la maduración de los quesos, donde se forma un consorcio de levaduras, bacterias y hongos durante la fase de maduración (Addis et al., 2001). Su contribución a la proteólisis y la lipólisis conduce a mejoras en la textura, el sabor y la calidad nutricional del queso (Hymery et al., 2014). **Las especies que contribuyen a la maduración de quesos son *P. camemberti*, *P. roqueforti*, *Penicillium caticulum*, *Mucor fuscus*, *Mucor lanceolatus*, *Fusarium domesticum*, *Sporendonema casei*, *Scopulariopsis flava*, y *Scopulariopsis fusca*** (Beresford y Williams, 2004; Gripon, 1993; Hermet et al., 2012; Ropars et al., 2012). Aunque las bajas temperaturas inhiben normalmente el crecimiento de los mohos, hay un número bastante significativo de mohos

Introducción general

que crecen a temperaturas de refrigeración como por ejemplo *P. commune* o *C. herbarum* (Adams y Moss, 2000).

El mayor problema que tienen los mohos en cuanto a su desarrollo en los quesos es que **determinadas especies pueden ser toxigénicas** por la producción de micotoxinas como **la patulina, el ácido penicílico producido por algunas cepas de *P. roqueforti* o ácido ciclopiaziónico producido por *P. camemberti* y *P. commune*** (Fagan *et al.*, 2017). Aunque estas micotoxinas se han encontrado en la superficie de los quesos se ha evidenciado de que la patulina ha difundido hacia el interior de los quesos en condiciones de almacenamiento (Pattono *et al.*, 2013). La contaminación del queso por micotoxinas puede ocurrir indirectamente a través de la contaminación de la leche o directamente por hongos filamentosos que producen micotoxinas (O'Brien *et al.*, 2004). Otras aflatoxinas se han encontrado también en quesos como AFG1 y AFB1, pero solo después de añadir intencionadamente las micotoxinas o cepas micotoxigénicas (Gürses *et al.*, 2004; Atasever *et al.*, 2010). Algo similar ocurre a la citrinina, producida por especies *Penicillium* y especies de *Aspergillus*. Así, mientras que las especies de *P. citrinum* y *P. verrucosum* sí que producen estas micotoxinas en quesos de manera estable (Frisvad *et al.*, 2007), no ocurre lo mismo con la especie *A. candidus*, la cual también produce esta micotoxina, pero solo se ha conseguido que se produzca bajo condiciones de laboratorio (Hymery *et al.*, 2014). **La citrinina suele estar asociada con la presencia de OTA, puesto que ambas están producidas por *P. verrucosum*** (Ostry *et al.*, 2013). En cuanto a OTA, al igual que la micotoxina anterior también puede ser producida por especies *Penicillium* y especies de *Aspergillus* (Benford *et al.*, 2007). Esta micotoxina junto con la AFM1 son las más tóxicas de las detectadas en queso (Hymery *et al.*, 2014). Al igual que las aflatoxinas, su presencia en queso puede ser debido a la presencia de mohos productores o por transferencia a través de la leche. Sin embargo, en este último caso, la microbiota del estómago de rumiantes disminuyen su toxicidad debido a su hidrólisis a OT α (Hymery *et al.*, 2014). Dall'Asta *et al.*, (2008) encontraron bajos niveles de OTA en quesos como Gorgonzola o Roquefort y su presencia se asoció al desarrollo fúngico. Más recientemente, Pietri *et al.* (2022) en queso duro "Grana" encontraron que el 48% de las muestras estaban contaminadas con OTA en niveles de 0-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En este mismo estudio el 100% de las muestras corteza analizadas estaban contaminadas en un mayor nivel, resaltando la importancia de la limpieza industrial para evitar su consumo en los quesos rallados. Contrariamente, Altafini *et al.* (2021) en muestras de queso de la región de

Boloña (Italia) encontró un nivel de incidencia mucho menor, solo el 14% de las muestras fueron positivas y al igual que Pietri *et al.* (2022) se asociaron a quesos de pasta dura. Por lo tanto, en general la incidencia de OTA en queso es baja a excepción de quesos de pasta dura y hay que extremar las precauciones en productos derivados de los mismos, como los quesos rallados (Altafini *et al.*, 2021).

II.2 Métodos de control

Los mohos que deterioran los alimentos también pueden tener el potencial de poner en peligro la salud a través de la producción de micotoxinas y de causar infecciones oportunistas en personas inmunodeprimidas (Benedict *et al.*, 2016). Por tanto, reducir la contaminación fúngica del entorno de producción de alimentos es una de las formas más eficaces de minimizar el deterioro de los alimentos, aumentando así su vida útil, y además protegiendo la salud del consumidor. La prevención del crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos ha avanzado gracias al desarrollo de diversos sistemas de conservación (Agriopoulou *et al.*, 2022). Sin embargo, en el control de mohos alterantes o patógenos hay cepas que pueden presentar una mayor prevalencia que otras por ser resistentes a fungicidas y conservantes. Esto es debido al uso excesivo de fungicidas de un solo objetivo y el cambio de formulaciones de alimentos para satisfacer las demandas del mercado (Davies *et al.*, 2021). Por tanto, uno de los retos más serios a los que se enfrenta la industria alimentaria en la actualidad es garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos mediante metodologías sostenibles y que no dañen el medioambiente. Para ello, los métodos de conservación aplicados para el control fúngico se pueden agrupar en físicos, químicos y biológicos (**Figura II.4**).

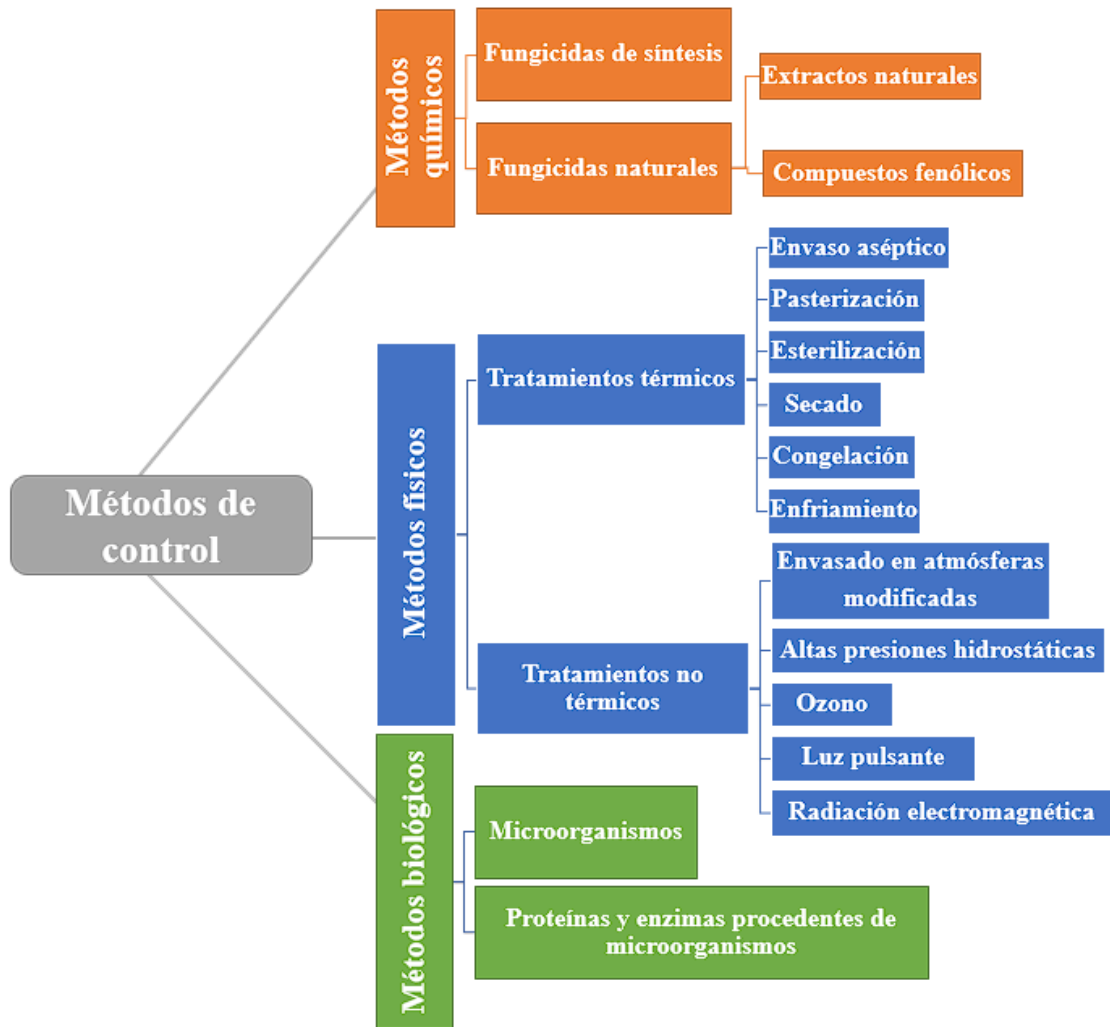


Figura II.4. Esquema general de los métodos de control antifúngicos usados en la industria alimentaria (Elaboración propia).

II.2.1 Métodos físicos

Los métodos físicos brindan un consumo de alimentos con una seguridad química (sin residuos químicos) y microbiana, para eliminar la necesidad de aditivos químicos, para conservar la calidad sensorial y nutricional de los ingredientes frescos y para mejorar la conveniencia de los alimentos procesados (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Por otro lado, la disponibilidad, el costo y la efectividad de las tecnologías de procesamiento térmico justifican por qué siguen siendo el método predominante para lograr la seguridad microbiana y la inactivación de enzimas y microorganismos responsables del deterioro de los alimentos (Torres *et al.* 2010). Entre los métodos físicos más utilizados son los tratamientos térmicos, el secado, pasterización, esterilización, envasado aséptico, congelación.

II.2.1.1 Tratamientos térmicos

El **secado o deshidratación** es el proceso de eliminación del agua de un alimento sólido o líquido por medio de la evaporación. El objetivo es obtener un producto sólido con un contenido de agua bajo. El agua es uno de los requisitos previos necesarios para que los microorganismos y enzimas actúen deteriorando el alimento (Amit *et al.*, 2017). El secado se puede clasificar en tres grandes grupos: convectivo, conductivo y radiactivo. El **secado por convección** es el método más popular para obtener más del 90% de los alimentos deshidratados. Dependiendo del modo de operación, los secadores se pueden clasificar como discontinuos o continuos. Para operaciones de menor escala y tiempos de residencia cortos, se prefieren los secadores por lotes. El método continuo de secado es preferible cuando se requieren operaciones periódicas prolongadas y se necesita reducir el costo del secado (Baker *et al.*, 1997). Una variante de este tipo de tratamiento es la deshidratación osmótica, que es el fenómeno de la eliminación de agua de una concentración más baja de soluto a una concentración más alta a través de una membrana semipermeable que da como resultado una condición de equilibrio en ambos lados de la membrana (Tiwari, 2005). Este tratamiento es común que se use en frutas, como la grosella, manzana, mango (Satya y Singh, 2014). También se ha usado en plátanos, albaricoque, trozos de sandía, granada donde redujo la actividad de agua y por tanto aumentó su vida útil (Ali *et al.*, 2010; Falade *et al.*, 2007; Ispir y Toğrul 2009; Mundada *et al.*, 2011). El uso de **deshidratación osmótica** se ha estudiado en frutas y verduras y, en menor medida, en productos alimenticios de origen animal como un paso de procesamiento previo a procesos como el secado al aire a alta presión que ofrece muchas ventajas (Giannoglou *et al.*, 2020). Con respecto al queso, la investigación se centra en el efecto de diferentes variables de procesamiento sobre el transporte de agua y sal inherente al proceso de salado del queso o sobre el transporte de agua inherente al proceso de maduración del queso (Castell-Palou *et al.* 2011; Fucà *et al.* 2012; Velázquez-Varela *et al.*, 2014; Lu y McMahon 2015). En queso feta, al combinar el efecto de deshidratación osmótica y el procesamiento de secado al aire dio como resultado la producción de un queso de alta calidad y una mayor vida útil (Giannoglou *et al.*, 2020).

La **pasterización** es una técnica de conservación en la que, además de las formas vegetativas de los microorganismos patógenos, las enzimas y microorganismos que causan el deterioro en los diferentes alimentos se destruyen al someter a dicho alimento

Introducción general

a un aumento de temperatura y tiempo específicos (Shenga *et al.*, 2010). Este tipo de tratamiento está ampliamente distribuido en la industria ya que reduce significativamente la población microbiana que pueda albergar en varias unidades logarítmicas, como demuestra un estudio realizado en zumo de naranja donde se redujo en varias unidades logarítmicas el crecimiento de todos los microorganismos incluidos los mohos (Yeom *et al.*, 2000) Este tipo de conservación se usa tanto en zumo de frutas, como en cerveza, leche o huevo líquido, alcanzando diferentes temperaturas en función del alimento que estemos tratando, como se puede observar en la **Tabla II.4**.

Tabla II.4. Condiciones y objetivos de la pasterización de diferentes alimentos (Shenga *et al.*, 2010).

Alimento	Propósito	Combinación de tiempo y temperatura
Zumo de frutas (pH < 4,5)	Inactivación de encima y destrucción de microorganismos alterantes	65 °C durante 30 min, 77 °C durante 1 min o 88 °C durante 15 s
Cerveza (pH < 4,5)	Destrucción de microorganismos alterantes	65 a 68 °C durante 20 min (en botella) o 72–74 °C durante 1–4 min a 900–1000 kPa
Leche (pH > 4,5)	Destrucción de microorganismos patógenos, alterantes y enzimas	63 °C durante 30 min o 71,5 °C durante 15 s
Huevo líquido	Destrucción de patógenos y alterantes	64,4 °C durante 2,5 min o 60 °C durante 3,5 min

Uno de los inconvenientes de este proceso es la **perdida de nutrientes** tras el procesado con altas temperaturas, como vitaminas y minerales como pueden ser la vitamina C, el calcio soluble, el fósforo, la tiamina y la vitamina B12 (Amit *et al.*, 2017), además de microorganismos beneficiosos.

La **esterilización térmica**, al igual que el proceso anterior es un proceso en el que se usa altas temperaturas, pero se utiliza para destruir por completo todos los microorganismos viables (bacterias, levaduras y mohos). Este proceso hace que la vida útil sea más larga, pero **se pierden mayor cantidad de nutrientes**, como son las grasas, proteínas y el azúcar que se pueden descomponer, además que los minerales y las vitaminas pueden perderse en el proceso también (Teixeira, 2006; Kirk-Othmer, 2007).

Este tipo de tratamiento es muy usado en la industria, sobre todo en zumos y néctares ya que disminuye significativamente toda la población microbiana de la matriz alimentaria, como demuestra un estudio realizado en zumo de uva donde redujo casi por completo los microorganismos con respecto al control (Ma *et al.*, 2020).

La **congelación**, al contrario que los métodos anteriores, disminuye la temperatura del alimento para que el agua forme cristales de hielo y así ralentizar las reacciones fisicoquímicas y bioquímicas, inhibiendo así el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos (George, 2008; Rahman y Velez-Ruiz, 2007). Al formar estos cristales de hielo, reduce la cantidad de agua líquida en los alimentos y disminuye la actividad de agua (Pardo y Niranjana, 2006). La congelación rápida es un tipo de congelación en el que los cristales de hielo son más pequeños y protegiendo así las estructuras de los alimentos y su textura. Este corto tiempo de congelación también impide la difusión de sales y descomposición de alimentos durante la congelación. Este tipo de conservación se usa para diferentes alimentos, como carnes, pescados, zumos de frutas, etc. Aunque se ha demostrado que el enfriamiento rápido no presenta ventajas respecto a la congelación tradicional en lo que respecta a la viabilidad de los mohos en quesos de acuerdo con lo observado en los estudios de Tejada *et al.* (2000, 2002).

II.2.1.2 Tratamientos no térmicos

El **envasado al vacío** es el método más simple y común para modificar la atmósfera interna de un paquete de alimentos. Esencialmente, consiste en eliminar el aire alrededor del alimento, utilizando un material de empaque con baja permeabilidad al oxígeno y otros gases. Este tipo de envase ha demostrado su capacidad para **reducir el daño oxidativo e inhibir el crecimiento de bacterias aerobias, mohos y levaduras**, aumentando así la vida útil por ejemplo del queso (Nájera *et al.*, 2021). A pesar de las ventajas del envasado al vacío, se han informado efectos negativos en quesos duros y semiduros. Por eso, aunque se envase al vacío a veces es necesario mantener en refrigeración el envase, puesto que puede haber mohos que con pequeñas cantidades de oxígeno pueden desarrollar deterioro en queso (Pitt y Hocking, 2009^e).

El envasado en **atmosferas modificadas** (MAP) de alimentos implica una composición diferente a la del aire de la atmósfera que rodea al alimento. Esta técnica ha

Introducción general

sido ampliamente utilizada para prolongar la vida útil de frutas y hortalizas al igual que para productos de origen animal como el queso. Las mezclas de gases utilizadas incluyen **diferentes porcentajes de dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N₂) y oxígeno (O₂)** en forma residual. En general, este método de conservación es altamente eficaz contra bacterias Gram (-) aerobias y mohos y, en menor medida, contra bacterias Gram (+) y el crecimiento de levaduras (Nájera *et al.*, 2021). Cuando los productos alimenticios contienen microorganismos viables, como los quesos de leche cruda o aquellos a los que se les han agregado iniciadores, el diseño de la atmósfera es más complejo porque es necesario controlar el crecimiento de microorganismos durante el almacenamiento. Se utilizan altas concentraciones de CO₂, particularmente en quesos duros y semiduros, para suprimir el crecimiento microbiano (Gonzalez-Fandos *et al.*, 2000; Todaro *et al.*, 2018). Sin embargo, particularmente para algunas variedades de queso, es **importante ajustar y controlar cuidadosamente el CO₂** durante el almacenamiento porque los microorganismos involucrados en el desarrollo del sabor del queso pueden verse afectados y puede incurrir en sabores extraños (Colchin *et al.*, 2001; Juric *et al.*, 2003; Romani *et al.*, 2002; Todaro *et al.*, 2018). Los resultados reportados en la literatura sobre la aplicación de una atmósfera compuesta únicamente por N₂ son diversos. El N₂ **actúa como un gas de relleno inerte**, evitando el colapso del paquete, y no tiene efectos perjudiciales sobre la composición y el sabor del queso (Esmer *et al.*, 2009; Juric *et al.*, 2003; Todaro *et al.*, 2018). Sin embargo, en el queso Cheddar rallado envasado en una atmósfera de N₂, se observaron cambios en el perfil de volátiles, con una alta concentración de metilcetonas, lo que indica que este queso era muy susceptible al crecimiento de moho (Colchin *et al.*, 2001). **El O₂ en atmósferas generalmente se evita para la conservación del queso** porque este gas promueve el crecimiento de moho y la oxidación de lípidos, lo que da lugar a sabores desagradables (Rodríguez-Aguilera y Oliveira, 2009).

La **irradiación** es un proceso físico en el que la sustancia sufre una dosis definida de radiación ionizante (Arvanitoyannis *et al.*, 2009). Este tipo de tratamiento de los alimentos que progresivamente se va implantando en la industria consiste en el **uso de la energía ionizante para la irradiación de alimentos**, con el uso de fotones γ emitidos generalmente por radioisótopos como ⁶⁰Co, o también ¹³⁷Cs. (Farkas y Mohácsi-Farkas 2011). Este método tiene **una gran capacidad de penetración**, permitiendo así el tratamiento de materiales con poca o nula manipulación (Calado *et al.*, 2014). El

mecanismo de acción de este tipo de tratamiento es causar un daño letal en la célula como la ruptura de la cadena de ADN, la ruptura de la membrana celular o daño mecánico en la pared celular (Lado y Yousef, 2002). Tsiotsias *et al.* (2002) en su estudio sobre queso de suero blando a dosis de 0,5, 2,0 y 4,0 kGy a 4 °C reportaron la ausencia de mohos en las muestras irradiadas, mientras que hubo una reducción en la población de levaduras que fue detectada posteriormente durante el almacenamiento. En queso mozzarella se realizó un estudio irradiando los quesos con haz de electrones, al cabo de los 90 días de maduración los recuentos de mohos se habían reducido por debajo del límite de detección en comparación con el lote control (Huo *et al.*, 2013).

La conservación mediante el uso de **altas presiones hidrostáticas** aplica una presión de hasta 900 MPa para **eliminar los microorganismos en los alimentos**. Además, también **retrasa la aparición de procesos de deterioro químico y enzimático**, incluso retiene las características físicas y químicas de los alimentos. Este proceso no degrada ni las vitaminas, ni sabores y el color se mantiene durante el proceso (Bhat *et al.*, 2011; Koutchma *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2007). Presenta como gran inconveniente la necesidad de un alto costo de capital. En diversos estudios, se ha reportado la disminución de bacterias patógenas tanto en leche cruda como en quesos en maduración, también la disminución de los recuentos de mohos y levaduras por debajo de los límites de cuantificación, como es el caso del estudio de Inácio *et al.* (2014), donde mediante un tratamiento de 400-600 MPa aplicado a queso de leche cruda de oveja redujeron el crecimiento microbiano sin afectar significativamente a las características fisicoquímicas. En otro estudio realizado en queso cheddar inoculados, este tipo de tratamiento produjeron una reducción de recuentos de mohos y levaduras en general, y en concreto redujeron en 7 unidades logarítmicas la población de *P. roqueforti* en quesos inoculados (O'Reilly *et al.*, 2000).

El procesamiento de alimentos con **campos eléctricos pulsados** (CEP) se define como una técnica en los que los alimentos se colocan entre dos electrodos y se exponen a un campo de alto voltaje pulsado (Amit *et al.*, 2017). En general, el tiempo de tratamiento con este proceso es inferior a un segundo (Leadley y Williams, 2006). La baja temperatura de procesamiento y el corto tiempo de permanencia de este proceso permiten **una inactivación altamente efectiva de los microorganismos** (Saldaña *et al.*, 2014). El proceso de CEP, es más eficaz para destruir las bacterias Gramnegativas que las

Introducción general

Grampositivas. Las células vegetativas son mucho más sensibles que las esporas a este proceso. Todas las muertes celulares ocurren debido a la interrupción de la función de la membrana celular y la electroporación (Jay *et al.*, 2005). La tecnología CEP **conserva el sabor, el aroma y el color de los alimentos** y además es inocua (Mohammed *et al.*, 2016). Sin embargo, este proceso **no tiene impacto sobre las enzimas y las esporas**. Tampoco es adecuado para materiales conductores y solo es efectivo **para tratar alimentos líquidos**. Este proceso consume mucha energía y puede presentar riesgos ambientales (Fellows, 2009, Mathavi *et al.*, 2013). Aunque puede reducir los recuentos de los microorganismos, como en el trabajo de Yeom *et al.*, (2000), donde analizaron los microorganismos que pudieran crecer en zumo de naranja después de haber recibido una dosis de campos pulsantes, lo cual hizo reducir entre 3 y 5 unidades logarítmicas el crecimiento de los mohos y levaduras en este tipo de zumo.

Otra tecnología prometedora, es el uso de **plasma frío** aplicado **sobre los envases de productos frescos** (Deng *et al.*, 2020). El tratamiento con este tipo de método durante más de 10 minutos redujo la contaminación de mohos en nueces (Devi *et al.*, 2017). En fresas, también se consiguió una reducción de los mohos en los paquetes de envasado, con un tratamiento de 5 minutos (Misra *et al.*, 2014).

Además de aplicar nuevas técnicas de conservación, la tendencia actual es utilizar en **combinación dos o más técnicas de conservación**, bien sean métodos químicos, físicos o biológicos. Un ejemplo es el uso de **ultrasonido combinado con un tratamiento a base de cloro** para aumentar la eficacia de desinfección (Zhou *et al.* 2016). Este tipo de tratamiento no sólo se aplican en alimentos si no para desinfectar envases, disminuyendo así la probabilidad de contaminación en cuanto a transporte y almacenamiento (Feng y Yang, 2011).

En general, el principal inconveniente que pueden tener los métodos físicos es que no eliminan la suciedad, como los restos de plantas y además pueden provocar daños físicos en los alimentos, como por ejemplo el tratamiento térmico. Otro inconveniente para tener en cuenta es que algunos de estos métodos pueden ser difíciles de implantar en la industria de alto rendimiento (Deng *et al.*, 2020; Feng y Yang., 2011). Además, tecnologías como el procesamiento con calor suave, el envasado en atmósfera modificada, el envasado al vacío y la refrigeración no son suficientemente eficaces para

eliminar patógenos indeseables ni retrasar el deterioro microbiano (Tajkarimi *et al.*, 2010).

II.2.2 Métodos químicos

En cuanto a los métodos químicos, el más ampliamente utilizado es el uso de plaguicidas para el control de plagas y probablemente lo seguirá siendo en un futuro cercano (Kaur *et al.*, 2017). Los **plaguicidas** se pueden clasificar de acuerdo con la plaga que controlan en tres grandes grupos: los **fungicidas** controlan hongos, los **herbicidas** controlan malezas y los **insecticidas** controlan insectos. Estos productos, **en su mayoría sintéticos**, contribuyen en gran medida al control de plagas y a la producción agrícola. Esto ha hecho que se conviertan en un componente importante, permitiendo así un aumento del rendimiento de los cultivos y la producción de alimentos (Carvalho, 2017).

II.2.2.1 Fungicidas y conservantes en frutas

Los fungicidas químicos se han utilizado durante mucho tiempo para controlar la pudrición postcosecha. En este sentido, la introducción de pesticidas sintéticos: pesticidas organofosforados en la década de 1960, carbamatos en 1970 y piretroides en 1980 y la introducción de herbicidas y fungicidas en 1970-1980 contribuyeron en gran medida para el control de plagas y la producción agrícola. Un pesticida debe ser letal para las plagas objetivo, pero no para especies no objetivo, incluido el hombre. Sin embargo, la **dependencia excesiva de los fungicidas** químicos tradicionales ha resultado en una variedad de problemas, tales como **residuos de fungicidas, contaminación ambiental** y aumento de la **resistencia de los patógenos** a los fungicidas (Alewu y Nosiri, 2011; Goulson, 2014; Hayes *et al.*, 2006; Mnif *et al.*, 2011; Pimentel, 2005; Sanborn *et al.*, 2007; WHO, 1990; Zhang *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2016).

Los numerosos **efectos negativos para la salud** que se han asociado con los plaguicidas químicos incluyen, entre otros, efectos **dermatológicos, gastrointestinales, neurológicos, cancerígenos, respiratorios, reproductivos y endocrinos**. Además, una alta exposición ocupacional, accidental o intencional a pesticidas puede resultar en hospitalización y muerte (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Estos productos no solo afectan a la salud humana, sino que también **degradan el medio ambiente natural** como, por ejemplo, contaminación del agua, el suelo y el aire, y los efectos tóxicos en organismos no objetivo (Bürger *et al.*, 2008, Mariyono, 2008). Otro inconveniente que

Introducción general

tiene este tipo de control es **la percepción negativa del consumidor**, es decir, los consumidores cada vez quieren alimentos que sean más naturales y que contengan menos aditivos sintéticos. Además, el uso intensivo de estos fungicidas sintéticos conduce al **desarrollo de patógenos resistentes** a dichos compuestos. Como resultado de esto, la Unión europea, lleva a cabo una estrategia llamada el **Pacto Verde Europeo**, que se creó en 2019, que tiene como objetivo iniciar una acción internacional para lograr objetivos económicos con un respeto mucho mayor por las prácticas ambientales y proclimáticas (Comisión Europea, 2019). Una de las premisas es **reducir al 50% el uso de plaguicidas químicos** y sus riesgos, también el **aumento de la agricultura ecológica**, que debería de ser como mínimo de un 25% para el año 2030 (Comisión Europea, 2020).

Este uso indiscriminado y excesivo por parte de los agricultores puede ser debido a la fácil disponibilidad y combinación entre ellos, puesto que estos parámetros junto con las dosis e intervalos de pulverización es responsabilidad del agricultor (Kaur *et al.*, 2017). Estas razones junto con que la población humana se encuentra en crecimiento exponencial, los conflictos que paralizan la producción de alimentos y desplazan a millones de refugiados y, los efectos del cambio climático en la agricultura agravan la escasez de alimentos en muchas regiones y exigen esfuerzos renovados en la producción de alimentos (Carvalho, 2017).

Dentro del grupo de los fungicidas, la **mayoría solo se pueden usar en el control de mohos en la fruta en la etapa de precosecha** o bastante antes de su consumo, mientras que conservantes permitidos como el ácido sórbico y sus sales se añaden en etapas cercanas a la distribución al consumidor (**Tabla II.5**). Aunque **los métodos más eficaces para controlar el deterioro de los alimentos se logran mediante los aditivos químicos de síntesis**, su percepción negativa del consumidor y la más severa regulación sobre el uso de fungicidas (Wisniewski *et al.*, 2016; Calvo *et al.*, 2017) **han aumentado el interés en nuevas alternativas para proteger los productos alimenticios mediante la sustitución de agentes sintéticos por compuestos naturales** (Mesías *et al.*, 2021; Parafati *et al.*, 2015; Russo *et al.*, 2017). Este tipo de alimentos orgánicos es preferido por los consumidores ya que utilizan menos energía y se producen empaquetados y transportes respetuosos con el medio ambiente. Además, la agricultura de este tipo de alimentos previene la contaminación del suelo, el aire, el agua y el suministro de alimentos (Ueasangkomsate y Santiteerakul, 2016).

Tabla II.5. Aditivos autorizados en derivados de frutas para el control de crecimiento de mohos (CODEX STAN 192-1995, Reglamento (CE) n° 1333/2008).

N° E	Nombre del aditivo	Nivel máximo	Fruta o derivado de fruta
Reguladores de la acidez			
E-300	Ácido ascórbico	3000 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos
		5000 mg/kg	Néctares de frutas y concentrado para néctares
E-330	Ácido cítrico	3000 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos
		5000 mg/kg	Néctares de frutas y concentrado para néctares
E-296	Ácido málico	BPF	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
E-338-343,450, 451 452, 542	Fosfatos ¹	1000 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
E-334, 335(ii) y 337	Tartratos ²	4000 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
Conservantes			
E-210-203	Benzoatos ³	1000 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
E-200, 202, 203	Sorbatos ⁴	1000 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
Antioxidantes			
E-301	Ascorbato de sodio	BPF	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
E-302	Ascorbato de calcio	BPF	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares
E 220-225, 539	Dióxido de azufre y sulfitos ⁵	50 mg/kg	Zumo de fruta y concentrados para zumos, Néctares de frutas y concentrado para néctares

¹: Incluye: ácido fosfórico (e-338), fosfato sódico (e-339i), fosfato disódico (e-339ii), fosfato trisódico (e-339iii), fosfato potásico (e-340i), fosfato dipotásico (e-340ii), fosfato tripotásico (e-340iii), fosfato cálcico (e-241i), fosfato dicálcico (e-341ii), fosfato tricálcico (e-241iii), fosfato de amonio (e-342i), fosfato diamónico (e-342ii), fosfato magnésico (e-343i), fosfato dimagnésico (e-343ii), fosfato trimagnésico (e-343iii), difosfato disódico (e-450i), difosfato trisódico (e-450ii), difosfato tetrasódico (e-450iii), difosfato tripotásico (e-450v), difosfato dicálcico (e-450vi), difosfato cálcico de dihidrógeno (e-450vii), difosfato magnésico de dihidrógeno (e-450ix), trifosfato pentasódico (e-451i), trifosfato pentapotásico (e-451ii), polifosfato sódico (e-452i), polifosfato potásico (e-452ii), polifosfato sódico-cálcico (e-452iii), polifosfato cálcico (e-452iv) y polifosfato amónico (e-452v).

²: Incluye; ácido tartárico (e-334), tartrato de sodio (e-335ii) y tartrato de potasio y sodio (e-337).

³: Incluye; ácido benzoico (e-210), benzoato de sodio (e-211), benzoato de potasio (e-212) y benzoato de calcio (e-213).

⁴: Incluye; ácido sórbico (e-200), sorbato de potasio (e-202) y sorbato de calcio (e-203).

⁵: Incluye; dióxido de azufre (e-220), sulfito de sodio (e-221), bisulfito sódico (e-222), metabisulfito sódico (e-223), metabisulfito potásico (e-224), sulfito potásico (e-225) y tiosulfato sódico (e-539).

Introducción general

En este contexto, **existe una creciente demanda para reducir el uso de productos químicos como agentes antimicrobianos** en el campo de la nutrición y para combatir diversas infecciones debidas a microorganismos cada vez más agresivos y resistentes al uso de antimicrobianos sintéticos. En esta dirección, las **sustancias derivadas de las plantas**, como los extractos hidroalcohólicos o los aceites esenciales, pueden jugar sin duda un papel fundamental. (Nazzaro *et al.*, 2017). La versatilidad de tales sustancias es enorme; una misma planta puede aportar un conjunto de sustancias con un espectro de acción muy amplio debido a su diferente estructura química. Estos **aceites esenciales** son **mezclas complejas de compuestos naturales, tanto polares como no polares** (Macwan *et al.*, 2016; Masango, 2005). Conocidos por sus propiedades antisépticas y medicinales (analgésicas, sedantes, antiinflamatorias, espasmolíticos, anestésicas locales, anticancerígenas), también se utilizan en embalsamamiento y, por su actividad antimicrobiana y antioxidante, como aditivos naturales en los alimentos. y productos alimenticios (Bakkali *et al.*, 2008; Božovic *et al.*, 2017; Burt y Reinders, 2003; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Las principales categorías de compuestos son **terpenos y terpenoides**; en menor medida también se pueden encontrar compuestos que contienen nitrógeno y azufre, cumarinas y homólogos de fenilpropanoides (Niu y Gilbert, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Hay diferentes tipos de extractos que se han usado en diferentes frutas como el extracto de limoncillo que es útil para minimizar las enfermedades, se utiliza como recubrimiento comestible en frutas enteras y cortadas como las manzanas Fuji, la granada la piña recién cortada y además la fresa o pera (Azarakhsh *et al.*, 2014; Jo *et al.*, 2014; Oms-Oliu *et al.*, 2008; Yousuf *et al.*, 2017). Otro tipo de extracto que se ha utilizado es el de *Aloe vera*, por ejemplo, en la banana ha demostrado ser eficaz en retardar la pérdida de peso de la fruta, además de incrementar su contenido de compuestos fenólicos y, por consiguiente, potenciar su capacidad antioxidante (Khaliq *et al.*, 2019; Majeed *et al.*, 2019). "También se ha experimentado rociando extracto de *Aloe vera* sobre uvas de mesa, lo cual ha resultado en la mejora de varias características como la reducción de la pérdida de peso, un aumento en los sólidos solubles totales, mayor firmeza de la baya, una mejor actividad enzimática optimizada y acidez titulable (Peyro *et al.*, 2017).

II.2.2.2 Fungicidas y conservantes en queso

Se pueden agregar conservantes a los alimentos para prevenir el crecimiento de hongos. Los aditivos alimentarios conservantes se pueden usar solos o junto con otros métodos de conservación de alimentos. Los conservantes pueden ser conservantes antimicrobianos, que inhiben el crecimiento de bacterias u hongos, incluido el moho, o antioxidantes como los absorbentes de oxígeno, que inhiben la oxidación de los componentes de los alimentos. Los **conservantes antimicrobianos** comunes incluyen propionato de calcio, nitrato de sodio, nitrito de sodio, sulfitos (dióxido de azufre, bisulfito de sodio, hidrogenosulfito de potasio, etc.) y disodio. Los beneficios y la seguridad de muchos **aditivos alimentarios artificiales** (incluidos los conservantes) son objeto de debate entre académicos y reguladores que se especializan en ciencia de los alimentos, toxicología y biología. Las **sustancias naturales** como la sal, el azúcar, el vinagre, el alcohol y la tierra de diatomeas también se utilizan como conservantes tradicionales. **Ciertos procesos** como la congelación, el encurtido, el ahumado y la salazón también se pueden utilizar para conservar los alimentos. Además de los métodos antes señalados, que, aunque efectivos, muchos no son aplicables a nivel industrial, está permitido la adición de los siguientes aditivos que se pueden observar en la **Tabla II.6**.

Introducción general

Tabla II.6. Aditivos autorizados en quesos para el control del crecimiento de mohos (CODEX STAN 283-1978, Reglamento (CE) n° 1333/2008).

Nombre del aditivo		Nivel máximo
Reguladores de la acidez		
E-170	Carbonatos de calcio	Limitada por las BPF ¹
E-504	Carbonatos de magnesio	
E-575	Gluconodelta-lactona	
Conservantes		
E-200	Ácido sórbico	3000 mg/kg calculados como ácido sórbico
E-201	Sorbato de sodio	
E-202	Sorbato de potasio	3000 mg/kg calculados como ácido sórbico
E-203	Sorbato de calcio	
E-234	Nisina	12,5 mg/kg
E-251	Nitrato de sodio	50 mg/kg, expresados como NaNO ₃
E-252	Nitrato de potasio	
E-280	Ácido propiónico	3000 mg/kg, calculados como ácido propiónico
E-281	Propionato de sodio	
E-282	Propionato de calcio	
E-1105	Lisozima	Limitada por las BPF
Sólo para el tratamiento de la superficie/corteza:		
E-200	Ácido sórbico	1000 mg/kg solos o mezclados, calculados como ácido sórbico
E-202	Sorbato de potasio	
E-203	Sorbato de calcio	
E-235	Natamicina	2 mg/dm ² de la superficie. Ausente a la profundidad de 5 mm
E-508	Cloruro de potasio	Limitada por las BPF

¹BPF: Buenas prácticas de fabricación

Para controlar el crecimiento de hongos en los productos lácteos, el **sorbato de potasio y la natamicina** son los principales conservantes utilizados, y la mayoría de los países han aprobado la natamicina para su uso en el tratamiento de la superficie del queso (Seol *et al.*, 2019). La natamicina es conocida por su eficacia en el control del crecimiento de hongos y ha sido un conservante en la industria alimentaria durante más de 30 años (Davidson y Doan, 2020; He *et al.*, 2019). Es un conservante natural derivado de *Streptomyces natalensis*. Las industrias alimentarias utilizan la natamicina por su efecto conservante en productos alimenticios como queso, salchichas, yogures, jugos y vinos, etc. (Dalhoff y Levy, 2015). Es más comúnmente preferido sobre los otros conservantes, ya que no tiene olor ni color. La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Administración de Alimentos y

Medicamentos (FDA) lo han catalogado como generalmente reconocido como seguro (GRAS) después de una evaluación exhaustiva, y siendo considerado como un conservante natural por la Unión Europea y etiquetado con número E. En un estudio reciente de Chen *et al.* (2020) demostraron que la combinación de natamicina-fludioxonil o natamicina-propiconazol tiene un efecto sinérgico que resultó en una reducción significativa, superando el 85% de *Penicillium digitatum* y la podredumbre agria producida por *Geotrichum candidum*, controlando así la pudrición de la fruta postcosecha de los cítricos. La natamicina también se puede usar en productos cárnicos, en frutas y vegetales, en productos de panadería y en productos fermentados como las aceitunas de mesa, incluso se usa en el envasado de alimentos (Meena *et al.*, 2021).

Los conservantes como los **ácidos sórbico, benzoico y propiónico** pueden inhibir el crecimiento de moho en quesos, excepto *P. roqueforti*. Esta especie es resistente y, en consecuencia, la especie de deterioro más importante, a excepción de los quesos de pasta azul (Filtborg *et al.*, 1996). En EE. UU. se permite el uso de sorbato en quesos a niveles inferiores al 0,3 %, calculado como ácido sórbico (Sengun *et al.*, 2008). Los propionatos están permitidos para el tratamiento superficial (como materiales de envoltura) de queso y productos de queso (Nielsen y Boer, 2004). El crecimiento de moho en los quesos también se puede reducir utilizando altas concentraciones de cloruro de sodio que disminuyen la actividad del agua requerida para el crecimiento y la producción de micotoxinas (Sengun *et al.*, 2008); sin embargo, tanto los factores organolépticos como las consideraciones de salud deben tenerse en cuenta en este contexto.

Los conservantes convencionales (**nitratos/nitritos, galato de propilo, benzoato de sodio y sulfitos, sorbato de potasio**) conllevan peligros químicos como residuos y también tienen efectos secundarios si se consumen por encima de los límites permitidos (Meena *et al.*, 2021). Por ejemplo, los nitratos/nitritos están asociados con la leucemia y el cáncer de estómago, los sorbatos y los ácidos sórbicos están relacionados con la urticaria y la dermatitis de contacto, los benzoatos provocan asma, alergias y erupciones cutáneas, etc. (Sharma, 2015).

II.2.3 Métodos biológicos

Entre las tecnologías alternativas de conservación de alimentos, se ha prestado especial atención a la **bioconservación** para prolongar la vida útil y mejorar la calidad higiénica, minimizando el impacto sobre las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos alimenticios perecederos. La bioconservación es una técnica de conservación de alimentos en la que se explota el **potencial antimicrobiano de los organismos naturales y sus metabolitos**. Es capaz de lograr un equilibrio de los estándares de seguridad necesarios con los medios tradicionales de conservación y la exigencia moderna de la seguridad y calidad de los alimentos.

El uso de la microbiota y/o antimicrobianos en la mejora de la vida útil de los alimentos es una nueva rama de la ciencia. Los microorganismos pueden proporcionar una herramienta útil para la lucha contra los mohos no deseados en diferentes matrices alimentarios. Sin embargo, aunque hoy en día **los microorganismos no son tan eficaces como los antifúngicos físicos y químicos**, si es verdad que producen menos problemas de salud en los consumidores. Además, estos prefieren los alimentos preparados con aditivos naturales en lugar de químicos; por lo que el uso de microorganismos como conservantes ha ido ganando interés en las industrias alimentarias (Carocho *et al.*, 2015). Por tanto, **el uso de microorganismos es una alternativa emergente contra el control de mohos y micotoxinas** (Delgado *et al.*, 2016) que están ganando popularidad en los últimos años. Sin embargo, aún es necesario más investigación para determinar los niveles de antimicrobianos naturales requeridos para una inhibición exitosa de los patógenos transmitidos por los alimentos, sus mecanismos de acción, y su seguridad (Taylor *et al.*, 2019).

En cuanto a la bibliografía disponible sobre los agentes antagónicos o agentes de biocontrol (BCAs), como se puede observar en la **Figura II.5**, hay una amplia disponibilidad de bibliografía referente al estudio de las bacterias en su uso como microorganismos antifúngicos, con 22,797 referencias en Scopus. En contraste, la cantidad de bibliografía disponible sobre levaduras como microorganismos antifúngicos es menos de la mitad.

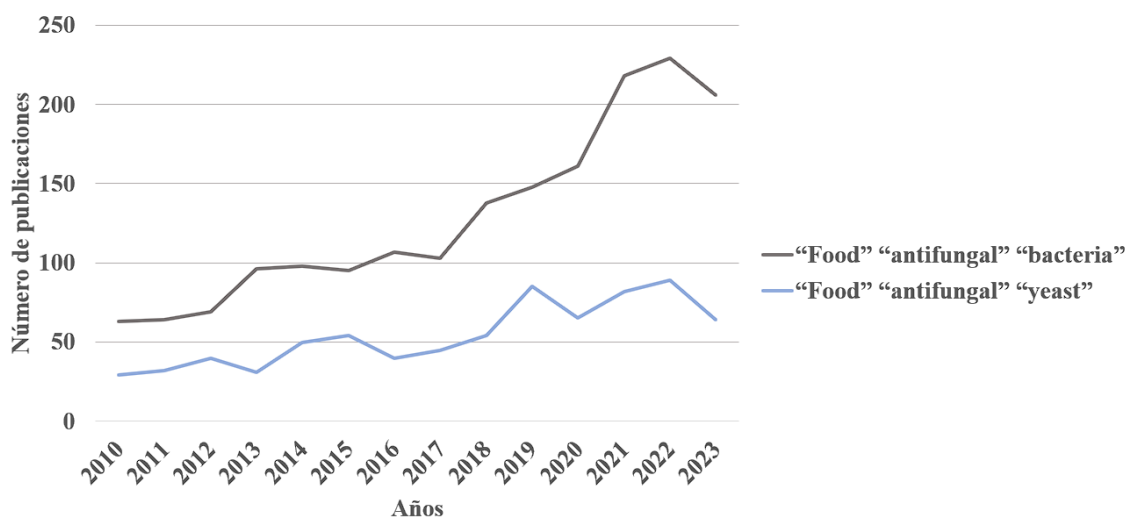


Figura II.5. Número de publicaciones científicas publicadas entre los años 2010 y 2023 con las palabras clave “Food” “antifungal” “bacteria” en gris y “Food” “antifungal” “yeast” en azul (Datos extraídos de la base de datos Scopus)

Se ha descrito una amplia variedad de microorganismos como agentes antagónicos o agentes de biocontrol (BCA). Entre las bacterias, los miembros de los géneros *Bacillus* spp. (Martínez-Absalon *et al.*, 2014), *Pseudomonas* spp. (Wafaa y Mostafa, 2012) o las **bacterias del ácido lácticas** (BAL) (Gajbhiye y Kapadnis, 2016) pueden controlar los hongos filamentosos. La producción de **ácidos orgánicos por BAL** y la disminución del pH constituyen los principales mecanismos de bioconservación en alimentos fermentados. Sin embargo, las cepas de BAL son capaces de producir otras **sustancias antimicrobianas como metabolitos de bajo peso molecular** (reuterina, reuteriicina, diacetilo, ácidos grasos), **peróxido de hidrógeno**, compuestos antifúngicos (propionato, fenil-lactato, hidroxifenil-lactato y 3-hidroxiácidos grasos), y **bacteriocinas** que pueden ser aprovechadas en la bioconservación de alimentos (Castellano *et al.*, 2017). En la industria de los cítricos, las bacterias de biocontrol como *Paenibacillus brasiliensis*, *Burkholderia gladioli* pv. *Agaricicola*, *Streptomyces* spp. y *Bacillus subtilis* ahora se aceptan como herramientas importantes para controlar las enfermedades de los cítricos (Elshafie *et al.*, 2012, Ketabchi *et al.*, 2012, Kotan *et al.*, 2009, Mohammadi, 2017; Tozlu *et al.*, 2019). En quesos también se han utilizado estas cepas dando buenos resultados como la cepa de *Lactocaseibacillus rhamnosus* A238 fue capaz de inhibir en refrigeración a *Penicillium chrysogenum* (Fernandez *et al.*, 2017).

Las especies de *Bacillus* pueden formar endosporas y producir varios **metabolitos valiosos, como antibióticos, enzimas, vitaminas y metabolitos**

Introducción general

secundarios, que son antimicrobianos o pueden promover el crecimiento de las plantas (Priest, 1993).

Algunos trabajos proponen **hongos filamentosos para el control de otros mohos** (Delgado *et al.*, 2016; Lone *et al.*, 2012). Por ejemplo, durante la maduración del queso la aplicación de *P. camemberti* y *G. candidum* es eficaz para competir eficientemente contra los mohos contaminantes (Hymery *et al.*, 2014). En otros productos de origen animal, como el salchichón, se aplican desde hace tiempo de manera comercial un cultivo iniciador de mohos no toxigénicos como son *P. chrysogenum* y *P. nalgiovense* (Bernáldez *et al.*, 2013). También se pueden usar mohos no toxigénicos para disminuir las micotoxinas, puesto que tiene capacidades detoxificantes, ya que pueden degradarlas (Nešić *et al.*, 2021). Por ello, la aplicación de cepas no toxigénicas de *A. parasiticus* NRRL 21369 y *A. flavus* NRRL 21882 en plantas (maíz, cacahuete, pistacho y algodón) ha conseguido resultados excepcionales en la eliminación de aflatoxinas. Esto se debe al hecho de que estos hongos comúnmente tienen la capacidad de degradación y probablemente conversión y utilización de los productos de degradación (Horn y Dorner, 2009).

Por otro lado, también se pueden emplear **proteínas procedentes de mohos**, como es el caso de la proteína PgAFP procedente de *P. chrysogenum*, la cual ha mostrado actividad frente a diferentes mohos toxigénicos como *A. flavus*, *P. restrictum* (Delgado *et al.*, 2015^a), *A. carbonarius* (Fodil *et al.*, 2018), *P. griseofulvum* (Delgado *et al.*, 2019^a), *P. italicum* (CECT 20909), *P. digitatum* (CECT 20795) (Delgado *et al.*, 2019^b), *P. expansum* (CECT 20907) (Delgado *et al.*, 2022). Esta proteína produce en el moho cambios metabólicos relacionados con la reducción del metabolismo energético, la alteración de la integridad de la pared celular y el aumento de la respuesta al estrés debido a los niveles más altos de ROS (Delgado *et al.*, 2015^b).

II.2.3.1 Levaduras antagonistas

Los estudios sobre **levaduras antagónicas** son cada vez más notorios durante los últimos años. Como resultado, se han descrito las capacidades antagónicas de numerosas especies de levaduras frente a patógenos en alimentos de origen animal y en alimentos de origen vegetal, como muestra la **Tabla II.7**.

Tabla II.7. Levaduras antagonistas confrontadas con diferentes mohos y en diferentes alimentos (Elaboración propia)

Especie	Matriz	Moho diana	Referencia
<i>Aureobasidium pullulans</i> L1 y L8	Manzanas	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Mari <i>et al.</i> , 2012 ^a
<i>Candida maltosa</i> NP9	Queso	<i>Aspergillus brasiliensis</i> NBRC 9455	Ando <i>et al.</i> , 2012
<i>Candida zeylanoides</i>	Jamón curado y medio a base de salchicha	<i>Penicillium nordicum</i> PN 44 <i>Aspergillus westerdijkiae</i> 6B/131	Meftah <i>et al.</i> , 2018
<i>Debaryomyces hansenii</i> CECT 10352 y 10353	Medio a base de tomate	<i>Alternaria tenuissima</i> T_50_H <i>Alternaria arborescens</i> T_2_L	Da Cruz Cabral 2021
<i>Debaryomyces hansenii</i> 135	Queso azul danablu	<i>Penicillium roqueforti</i> Roq 1, CSL y PV	Van Der Tempel y Jakobsen, 2000
<i>Debaryomyces hansenii</i> 253H y 226G	Lonchas de jamón	<i>Penicillium nordicum</i> Pn9035 y Pn323.92	Andrade <i>et al.</i> , 2014
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> L479	Manzanas y nectarinas	<i>Cladosporium cladosporioides</i> M310 y M624 <i>Botrytis cinerea</i> CECT 20518	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> , 2016
	Ensayo de laboratorio	<i>Aspergillus flavus</i> CQ8	Tejero <i>et al.</i> , 2021
<i>Hanseniaspora uvarum</i> L479	Ensayo de laboratorio	<i>Aspergillus flavus</i> CQ8	Tejero <i>et al.</i> , 2021
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> L672	Pera, cereza y melocotón	<i>Penicillium expansum</i> PE-M639	De Paiva <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pichia caribbica</i> JSU-1	Manzanas	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2013 ^a

El papel de las levaduras ha cobrado importancia en detrimento de las bacterias o los mohos (Sharma *et al.*, 2009), debido a que **algunas cepas de levaduras muestran la mayoría de las características deseables de un agente de biocontrol ideal** (Wilson y Wisniewski, 1989). Muchas especies han sido propuestas como candidatas para uso industrial debido a sus capacidades antagónicas, entre ellas varias cepas de *Metschnikowia pulcherrima* (Piano *et al.*, 1997, Spadaro *et al.*, 2002). Otra especie del género *Metschnikowia*, como *Metschnikowia fructicola*, y en concreto el aislado NRRL Y-30752 recientemente ha sido aprobado como agente de protección de plantas contra enfermedades fúngicas en frutas de hueso, fresas y uvas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2015, 2017).

Introducción general

Otras levaduras que están registradas y pueden ser comercializados como productos fitosanitarios son *Candida oleophila* cuyas cepas I-182 y O se han desarrollado en los productos de biocontrol Aspire® y Nexy®, respectivamente. Esta última fue la primera levadura de biocontrol registrada contra una enfermedad postcosecha (Wisniewski *et al.*, 2007) y la cepa O de *C. oleophila* fue aprobada como agente fitosanitario en Europa en 2013 (Comisión Europea, Dirección General de Salud y Consumidores, 2013; EFSA., 2012). Por otro lado, tenemos *Aureobasidium pullulans*. Los dos productos registrados que contienen *A. pullulans*, Blossom® y Boni-Protect® contienen dos cepas diferentes, aunque pertenecen a la misma especie.

Así, las levaduras, hoy día son una de los principales BCA (Ehlers, 2011). Varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (p. ej., DISAABA1182, RC008, RC009, RC012 y RC016) redujeron el crecimiento de patógenos vegetales como *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* o *F. graminearum* y también inhibieron las micotoxinas (p. ej., aflatoxina, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol) producida por estas especies (Armando *et al.*, 2012, 2013; Cubaiu *et al.*, 2012). Por lo tanto, *S. cerevisiae* se considera un organismo de biocontrol prometedor para reducir el crecimiento de patógenos fúngicos y micotoxinas en frutas, verduras y piensos (Cubaiu *et al.*, 2012; Dogi *et al.*, 2011; Pizzolitto *et al.*, 2012; Prado *et al.*, 2011). Sin embargo, la única aplicación registrada, de compuesto activo y biocontrol comercial de la levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) es el producto Romeo® con Cerevisane® como ingrediente activo (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), 2017). Este preparado se utiliza como inductor preventivo de resistencias sistémicas contra el mildiú polvoroso y vellosa en uvas, frutas y hortalizas, por lo que representa un producto de aplicación y fitosanitario que se diferencia de otras soluciones similares en que no se basa en células vivas activas (Freimoser *et al.*, 2019).

En resumen, todas estas cepas pertenecen a especies de levaduras que están presentes de forma natural y aparentemente endémicas de las superficies de la fruta representando el grupo principal de estos microorganismos que se utilizan para controlar las enfermedades postcosecha (Liu *et al.*, 2013). Al igual que ocurre en la fruta, las levaduras que están presentes en la leche cruda colonizan rápidamente la superficie de los quesos, ya que están muy bien adaptadas a crecer a pH bajos e intermedios, así como crecer a bajas temperaturas (Fröhlich-Wyde *et al.*, 2019).

II.3 Mecanismos de control de biológico

Entender los mecanismos que confieren la actividad de biocontrol es la base para el desarrollo y aplicación de las levaduras como de agentes biocontrol (Spadaro y Droby, 2016). La puesta en práctica de los métodos de biocontrol ofrece distintos beneficios, no solo la disminución de los agentes causantes de enfermedades sino la protección de los cultivos a un bajo costo, una disminución de la contaminación de los suelos, del agua y de las plantas tratadas y, por tanto, una disminución de la gestión de los residuos de los tratamientos (McDonald, 2014). En cuanto a otros productos como el queso, el objetivo es la reducción de la contaminación por micotoxinas ya que la presencia de hongos filamentosos forma parte del proceso de maduración de alimentos de origen animal madurados y fermentados (Hernández *et al.*, 2022).

En general, los microorganismos que contribuyen al biocontrol pueden ejercer su acción por **mecanismos directos**, por ejemplo, competición con el patógeno por los nutrientes, por inhibición de crecimiento por secreción de antibióticos o toxinas, o control de la población por hiperparasitismo. En cuanto a los **mecanismos indirectos** destaca la inducción de resistencia frente a los diversos patógenos. Los microorganismos que tienen estas particularidades se les conoce con el nombre de **microorganismos antagonistas** (Freimoser *et al.*, 2019, Živković *et al.*, 2010). Estos microorganismos antagonistas deben tener, además, unas **características comunes** para ser considerados efectivos: que sean seguros para que no contribuyan en riesgo alguno para la salud de los seres vivos que se alimentan del producto, que sean estables y que mantenga la actividad inhibidora durante el almacenamiento y por tanto que sigan siendo eficaces y activos ante los diferentes patógenos. Por supuesto, también deben ser resistentes a la selección a la hora de hacer los ensayos y resistentes a los patógenos diana por los que son seleccionados. Además, deben tener, como propiedad complementaria, que no se neutralicen por la actividad antagonista del entorno alimentario, como puede ser el pH, grasas, proteólisis etc., y ser compatible con la fisiología y características químicas del alimento. Por último, que elimine por completo su patógeno diana en vez de ralentizar su crecimiento (Jones *et al.*, 2011). Todas estas características se resumen en la **Figura II.6**.

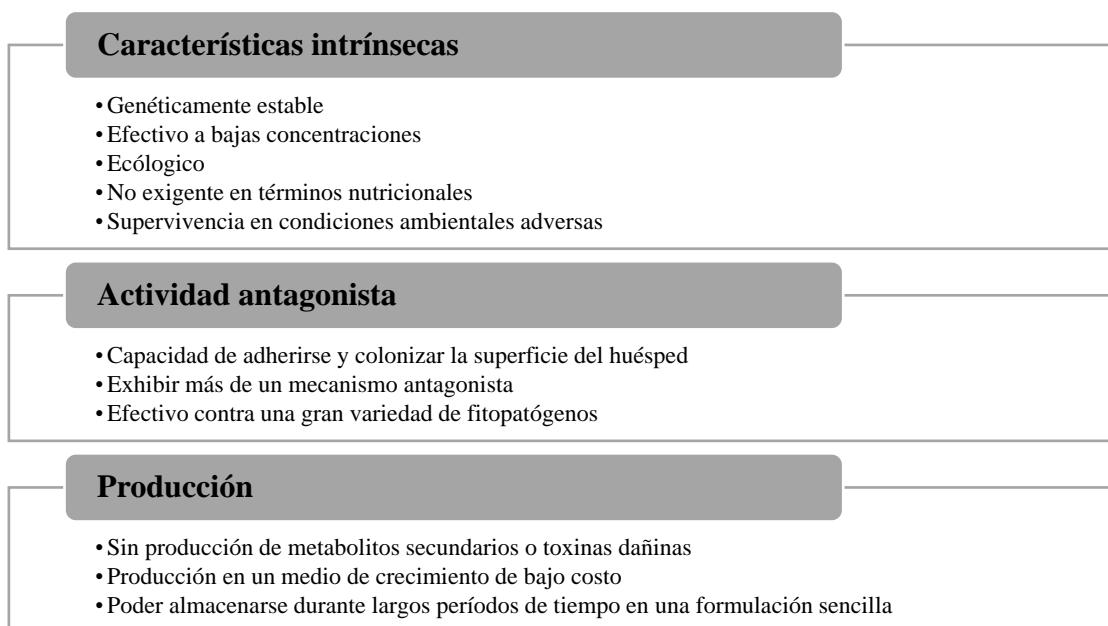


Figura II.6. Características deseables de un microorganismo antagonista (Modificado de Carmona-Hernández *et al.*, 2019).

El uso de levaduras como agentes de biocontrol presenta ventajas frente a otros microorganismos como hongos filamentosos y bacterias, ya que sus requerimientos nutricionales son sencillos, permitiendo la colonización de una amplia gama de sustratos, y a su vez no producen esporas alergénicas, micotoxinas o antibióticos (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007; Freimoser *et al.*, 2019; Hernández-Montiel *et al.*, 2021). Aunque las levaduras no están tan ampliamente estudiadas como las bacterias en cuanto a microorganismos antagonistas en diferentes matrices alimentarias (fruta, carne y lácteos) (**Figura II.7**), el incremento en número de publicaciones sobre el antagonismo de levaduras se ha hecho notable en los últimos años, según la base de datos Scopus.

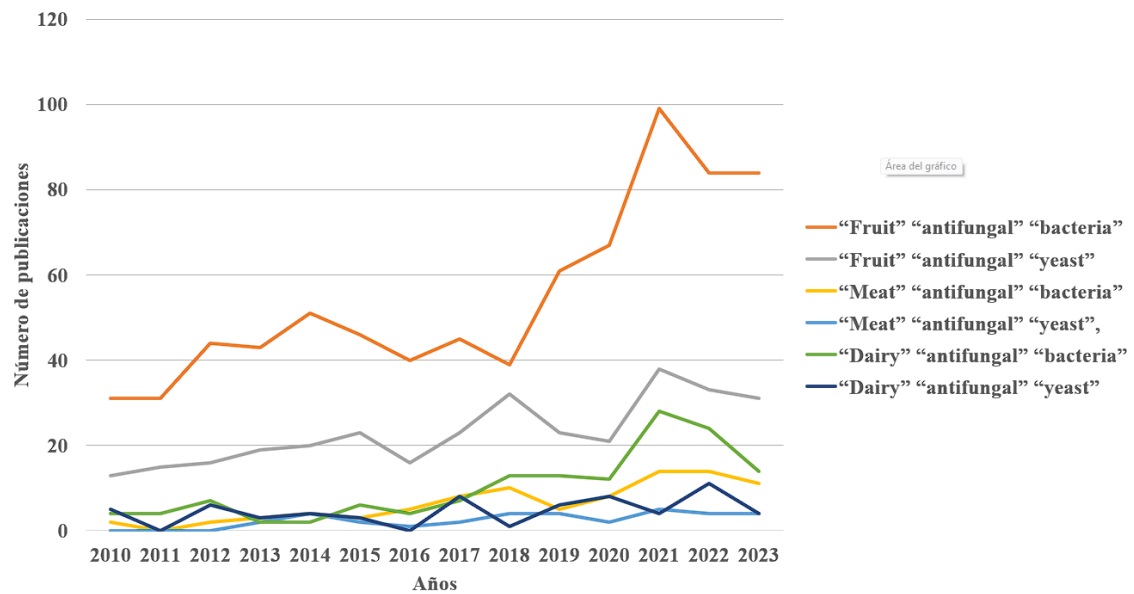


Figura II.7. Evolución del número de publicaciones en el periodo 2010 a 2022 con las palabras clave en naranja “Fruit” “antifungal” “bacteria”, en gris “Fruit” “antifungal” “yeast”, en amarillo “Meat” “antifungal” “bacteria” y en celeste “Meat” “antifungal” “yeast”, en verde “Dairy” “antifungal” “bacteria” y em azul oscuro “Dairy” “antifungal” “yeast” (Datos extraídos de la base de datos Scopus).

En la actualidad, se conocen varios mecanismos principales por los cuales las levaduras son capaces de controlar o incluso inhibir el crecimiento de sus objetivos diana (**Figura II.8**).

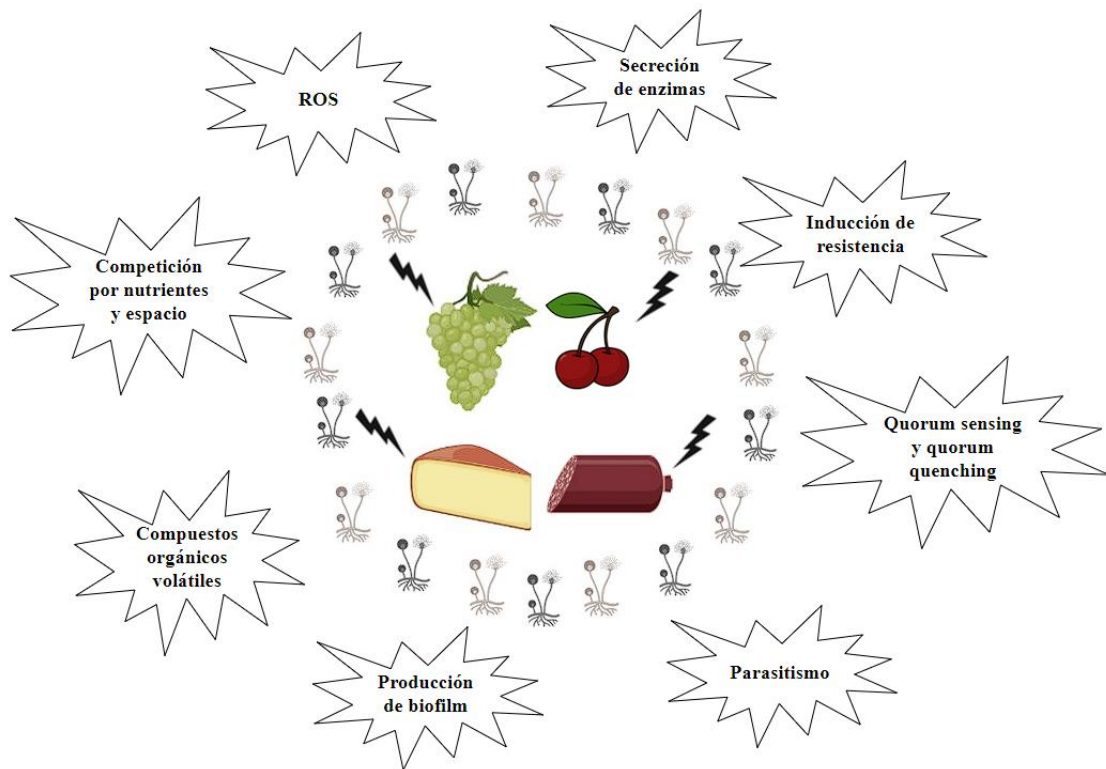


Figura II.8. Principales mecanismos de biocontrol por parte de las levaduras antagonistas (Elaboración propia).

II.3.1 Competición por nutrientes y espacio

Tanto los mohos patógenos como las levaduras antagonistas requieren nutrientes y espacio para poder desarrollarse y reproducirse. Por eso, este mecanismo de biocontrol se considera el modo principal por el cual las levaduras con actividad antagónica suprimen los patógenos fúngicos (Liu *et al.*, 2013; Spadaro y Droby, 2016). Cuando las levaduras llegan a la matriz alimentaria, la colonizan y consumen todos los nutrientes impidiendo así que las esporas de los diferentes mohos que haya en el ambiente germinen y crezcan (Zhang *et al.*, 2020). Esto puede ser debido a que sobre todo los microorganismos antagonistas limitan el crecimiento de los hongos por el consumo de sus diferentes **fuentes de carbono**, entre otras, como se ha demostrado en diferentes estudios *in vitro* (Adrees *et al.*, 2019).

Otras fuentes como son el nitrógeno y el hierro son también nutrientes principales para el crecimiento de los microbios. En comparación con los hidratos de carbono, **el nitrógeno es factor limitante en el crecimiento de patógenos en frutas**, porque estas

son ricas en azúcar, pero tienen cantidad limitada de aminoácidos (Zhang *et al.*, 2020). **El hierro**, por otro lado, también tiene una gran importancia puesto que es un componente de los citocromos, proteínas con el grupo hemo y proteínas sin el grupo hemo, además de ser un cofactor de varias enzimas que producen los hongos (Dukare *et al.*, 2019, Talibi, 2014). El hierro, además tiene otra característica, puesto que algunas levaduras pueden producir **sideróforos**, que son pequeñas moléculas peptídicas que contienen cadenas laterales y grupos funcionales que pueden producir un conjunto de alta afinidad a los iones de hierro (Golonka *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Estas moléculas desplazan e inhiben el crecimiento de mohos en el huésped, porque limita la germinación de esporas y del micelio (Cordova-Albores *et al.*, 2016).

En este tipo de competencia los antagonistas antifúngicos suelen tener una **actividad fungistática**, es decir que resultan en una inhibición de la germinación de las esporas de los hongos, aunque siguen vivas, ya que si se le añade posteriormente nutrientes serían capaces de germinar. Por esta razón, es necesario complementar este tipo de tratamiento con otros modos de acción, ya que podrían ser determinantes para el control de la enfermedad (Di Francesco *et al.*, 2016).

Es lógico pensar que la composición de los **diferentes sustratos influye en el crecimiento** de las poblaciones de levaduras. Por ejemplo, Mari *et al.* (2012^b) evaluaron la dinámica poblacional de dos cepas de *A. pullulans* L1 y L8, las cuales mostraron diferentes tasas de crecimiento con respecto a los tipos de frutas donde se aplicaron. Tanto es así que, en las heridas de manzana, el tamaño de la población aumentó 7 veces la concentración inicial, mientras que en las heridas de melocotón solo se observó un crecimiento débil, aunque fue suficiente para controlar la pudrición producida por *Monilinia* spp. Otro ejemplo claro de este tipo de mecanismo de control mostrado por las levaduras *M. pulcherrima* L672 y *Hanseniaspora opuntiae* L479, aisladas de higo y breva. Estas levaduras consiguieron reducir en ensayos *in vitro* e *in vivo* en manzana y nectarina el crecimiento de cuatro mohos patógenos de postcosecha, *P. expansum* M639, *B. cinerea* CECT 20518, *M. laxa* CA1 y *C. cladosporioides* M310 (Ruiz-Moyano *et al.*, 2016). Recientemente, el tratamiento en precosecha y postcosecha con cepas antagonistas de la especie *M. fructicola* ha mostrado capacidad de modificar positivamente la microbiota de la superficie en manzanas y fresas, reduciendo la presencia de mohos alterantes mediante competición por el espacio y nutrientes, entre otros mecanismos

Introducción general

(Biasi *et al.*, 2021; Zhimo *et al.*, 2021). En quesos, por ejemplos la levadura *Debaryomyces hansenii* B9010 consiguió inhibir el crecimiento de diferentes mohos *Aspergillus* sp., *Byssochlamys nivea*, *Cladosporium* sp., *P. candidum* y *P. roqueforti* (Liu y Tsao, 2009^a). Otra cepa de esta misma levadura, *D. hansenii* DH253 redujo el crecimiento de mohos micotoxigénicos en alimentos cárnicos curados (Andrade *et al.*, 2014).

Obviamente, no solo la composición de la matriz alimentaria puede interferir en la actividad de los diferentes BCAs, ya que la microbiota natural presente provocan una gran variedad de mecanismos que influyen en la colonización de nichos ecológicos mediante la competición por nutrientes y espacio, además de **producción de metabolitos secundarios tóxicos** para otros microorganismos (Gálvez *et al.*, 2012). Un ejemplo de este tipo de interacciones se puede observar en el estudio de Simoncini *et al.* (2014), en el que inocularon *P. nordicum* y varias cepas de *D. hansenii* (78 y 147) en jamón curado. En este estudio las levaduras inoculadas fueron más predominantes en muestras higienizadas que en las que no, además de presentar una reducción menor del crecimiento del moho, deduciéndose que los microorganismos autóctonos del jamón curado también pueden interferir en el comportamiento de los BCAs.

II.3.2 Producción de biofilm

Las biopelículas o biofilms son comunidades microbianas densas encapsuladas por una matriz extracelular polimérica adheridas a diferentes superficies entre las que se encuentra la fruta y los productos lácteos y (Parafati *et al.*, 2015). Tanto la formación de biofilm como la presencia de biofilm maduro suele estar asociado con mecanismos tanto de competición por nutrientes y espacio como parasitismo (**Figura II.9**). En el caso mostrado en la **Figura II.9**, la levadura (*Meyerozyma caribbica*), como colonizadora primaria, excluye a los demás colonizadores potenciales, ya sea por la producción de metabolitos secundarios o por la competición de espacio y nutrientes (Bautista-Rosales *et al.*, 2013).

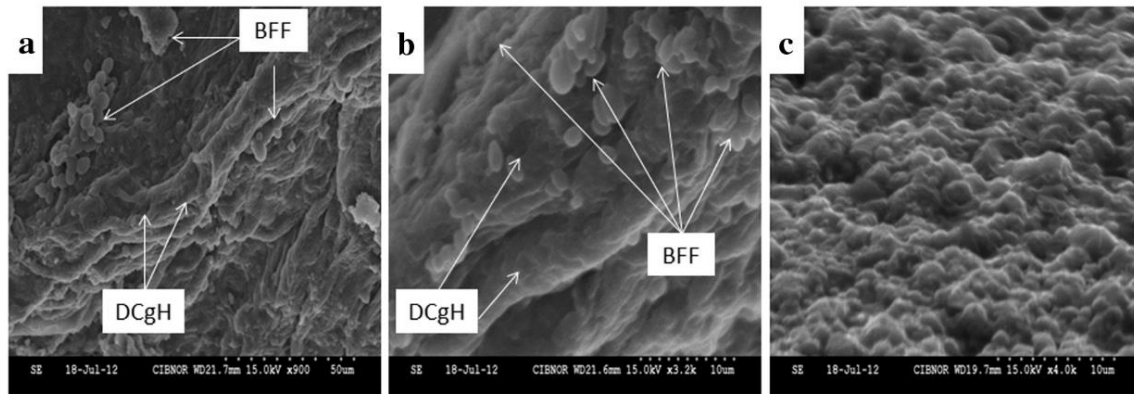


Figura II.9. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de la interacción entre las hifas de *Meyerozyma caribbica* L6A2 y *Colletotrichum gloeosporioides* inoculadas mediante pipeteo directo sobre las heridas del mango (a y b) e inoculadas en PDB (c) después de 36 h. Se observa la formación de biofilm (BFF) y deformación de hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* (DCgH). Ampliación de 900x (a), 3200x (b) y 4000x (C) (Bautista-Rosales *et al.*, 2013).

Diferentes especies de levadura como, por ejemplo, *S. cerevisiae*, han mostrado contener varios genes responsables de la adhesión (Smukalla *et al.*, 2008). Sin embargo, se sabe poco sobre el papel de las biofilms en la actividad de biocontrol de levaduras antagonistas para controlar diferentes mohos alterantes en diferentes matrices alimentarias y los mecanismos involucrados en su formación. Los experimentos realizados con *S. cerevisiae*, capaz de formar un biofilm en cultivo líquido, han demostrado su eficacia contra algunos patógenos en fruta. La actividad de biocontrol de cepas de *S. cerevisiae* formando biofilms, está estrechamente relacionada con la fase morfológica de la recolección de células después de crecer en cultivo líquido. Solo las levaduras recolectadas en la fase de biofilm son efectivas para limitar el crecimiento de patógenos, y aparentemente capaces de colonizar de manera más eficiente la superficie interna de las heridas artificiales. En esta relación, la capacidad de formar biofilms y el crecimiento filamentoso a menudo están correlacionados (Ianiri *et al.*, 2013).

La capacidad de formar biofilms también ha sido propuesta como un mecanismo de acción efectivo en otras levaduras de biocontrol (Fiori *et al.*, 2008). Concretamente, una cepa de *Pichia fermentans*, que controla la podredumbre marrón en la manzana, se convirtió en un patógeno destructivo cuando se aplicó en melocotón. En las superficies de las manzanas y dentro de las heridas de las manzanas, el antagonista conserva su forma similar a la de una levadura, mientras que la colonización del tejido de del melocotón

Introducción general

siempre se caracteriza por una transición del crecimiento en gemación a crecimiento de las pseudohifas. Esto sugiere que el crecimiento de las pseudohifas podría desempeñar un papel importante en el control de crecimiento contra mohos de la levadura *P. fermentans* en melocotones (Spadaro y Droby, 2016).

En otros productos vegetales, como son las aceitunas mesa, donde las levaduras tienen un papel central en su procesado (Zara *et al.*, 2020), la especie *Candida boidinii* pueden coagregarse en la superficie de las aceitunas junto con BAL y establecer biofilms polimicrobianas (Arroyo-López *et al.*, 2012; Benítez-Cabello *et al.*, 2015). Recientemente, la presencia de levaduras formadoras de biofilms como *Candida* spp. y *Pichia* spp. ha sido detectada en aceite de oliva por Santana *et al.* (2018). Además, estas levaduras formadoras de biofilms contribuyen positivamente a la fermentación y maduración de la aceituna (Camiolo *et al.*, 2017; Porru *et al.*, 2018).

Con respecto a alimentos de origen animal, levaduras asociadas a la microbiota y maduración del queso, como *K. marxianus*, ha mostrado también capacidad de formar biofilm (Perpetuini *et al.*, 2018, 2019).

II.3.3 Inducción de resistencia del huésped

Las plantas se defienden con una amplia variedad de mecanismos físicos y químicos contra los patógenos, por tanto, mejorar esta resistencia es una estrategia agronómica para prevenir pérdidas en los cultivos (Köhl *et al.*, 2019). La inducción de la resistencia del huésped es la capacidad de un microorganismo antagonista para provocar una respuesta de defensa en el huésped a través de varias reacciones químicas o bioquímicas, incluidos cambios en la estructura del tejido o la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (Bahadou *et al.*, 2018). Hasta hace dos décadas no se conocían los beneficios de la resistencia inducida en el ámbito de la postcosecha. Un ejemplo de este tipo de mecanismo es el centrado en el efecto de *Pichia membranaefaciens* contra *P. italicum* y *P. digitatum* en cítricos. En las frutas inoculadas o sumergidas en una suspensión de esta *P. membranaefaciens* se produjo un aumento del contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y enzimas como la peroxidasa o la polifenol oxidasa que permitieron reducir la incidencia de los mohos patógenos (Luo *et al.*, 2012). En cítricos también se ha comprobado la efectividad de *Cryptococcus laurentii* contra *G. citri-aurantii*, donde la levadura desarrolló diferentes mecanismos de acción. Además de la inducción de respuestas defensivas del huésped también presentó

competencia de nutrientes y espacio y la secreción de metabolitos secundarios tóxicos (Liu *et al.*, 2010^a). El tratamiento con levaduras antagonistas puede aumentar la expresión de genes relacionados con la defensa y mejorar las actividades de las enzimas relacionadas con la defensa (Zhang *et al.*, 2020). Así, por ejemplo, la cepa *M. pulcherrima* T-2 controla el crecimiento de *B. cinerea* en uva mediante el aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes como peroxidasa, catalasa y la fenilalanina amoníaco liasa. Además, el contenido de fenoles y flavonoides totales y los niveles de expresión de genes de enzimas aumentaron después del tratamiento con T-2 (Wu *et al.*, 2022). Esta **respuesta inmune** viene dada por la sobreproducción de diferentes enzimas y metabolitos, concretamente:

- **Proteínas ligadas a la patogenicidad**, como glucanasas, quitinasas, peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa (que protege el tejido contra el daño oxidativo) o proteínas inhibidoras o proteínas transportadoras de lípidos.
- **Compuestos con actividad microbiana** como fitoalexinas.
- **Papilas formadas por callosa y lignina** depositadas en la pared celular aumentando así el fortalecimiento de la planta.
- Otros comportamientos que pueden desencadenar la inmunidad son la producción de **especies reactivas al oxígeno (ROS)** o bien el cierre de los estomas (Carmona-Hernández *et al.*, 2019).

II.3.4 Parasitismo y producción de enzimas

El parasitismo directo o hiperparasitismo, es la capacidad de un microorganismo antagonista de unirse a las hifas de hongos patógenos y producir enzimas líticas de la pared celular (Dukare *et al.*, 2019).

En las paredes de las células fúngicas, la quitina como columna vertebral estructural está dispuesta en capas ordenadas regularmente, y el β -1,3-glucano como material de relleno está dispuesto de manera amorfa. El glucano es el principal polisacárido estructural de la pared celular fúngica y constituye aproximadamente el 50-60% del peso seco de la pared. El β -1,3-glucano se considera el principal constituyente estructural al que se unen covalentemente otros componentes de la pared celular, proporcionando a la pared celular resistencia mecánica e integridad. La quitina es un homopolímero lineal e insoluble compuesto por subunidades unidas a β -1,4 del amino

Introducción general

azúcar acetilado N-acetilglucosamina. Las paredes celulares de los hongos filamentosos consisten en hasta un 20% o más de quitina (Seidl, 2008). Además, las proteínas representan aproximadamente del 20 al 30% de la pared celular. La mayoría de las proteínas de la pared celular son glicoproteínas extensamente modificadas con oligosacáridos ligados a oxígeno y nitrógeno. Las proteínas de la pared celular juegan un papel importante en el mantenimiento de la forma celular, mediando la adhesión para la migración y fusión celular, protegiendo la célula contra sustancias extrañas, mediando la absorción de moléculas, sintetizando y remodelando los componentes de la pared celular.

El término parasitismo solo se aplica a MBCA (agente microbiológico de biocontrol) vivos, puesto que es la interacción entre dos organismos, un virus en bacterias, llamado bacteriófago (Buttimer *et al.*, 2017), una bacteria que se alimenta de un moho, llamada micófago (Scheublin *et al.*, 2020). Por último, tenemos el parasitismo hongo-hongo, llamado también **micoparásitos** (Viterbo y Horwitz, 2010). Este tipo de actividad antagonista aparece como un proceso complejo y depende de varios mecanismos que puede sucederse de manera consecutiva o bien conjuntamente. El anfitrión puede actuar a distancia, sin contacto físico, mediante señales que pueden ser liberadas por la acción de las **enzimas degradativas** de la pared celular del huésped (Viterbo y Horwitz, 2010). En situaciones de deficiencias nutricionales del medio, las levaduras pueden absorber los nutrientes de las células del moho, provocando la muerte de estas células “diana” (Zhang *et al.*, 2020). Durante este proceso, las hifas de los mohos sufren alteraciones (Di Francesco *et al.*, 2016). Varias enzimas, están involucradas en la degradación de la pared celular del patógeno fúngico, especialmente β -1,3-glucanasa, quitinasa y proteasas (Spadaro y Droby, 2016).

Dentro de las posibles enzimas hidrolíticas, en primer lugar, la secreción de **enzimas quitinolíticas** es una característica deseable de un agente de biocontrol, puesto que degrada la pared celular de los mohos (Zajc *et al.*, 2019). Además, es probable que las quitinasas también sean responsables indirectamente del control biológico por parte de las levaduras hacia los mohos, puesto que los quitinolisacáridos o CHOS, que son el resultado de la degradación de la quitina, son potentes inductores de la respuesta inmune de las plantas (Kombrink *et al.*, 2011; Langner y Göhre, 2015; Liu *et al.*, 2012, 2014). Un ejemplo de este tipo de mecanismo es el que ejerce *C. laurentii* frente a *P.*

expansum en peras (Yu *et al.*, 2008) o *M. pulcherrima* BIO126 frente a *B. cinerea* en manzanas (Spadaro *et al.*, 2002).

En segundo lugar, están las **glucanasas**, las cuales inducen en la pared celular de las cepas sensibles modificaciones estructurales, con una mayor actividad citocida específica y además una acción selectiva hacia las células diana (Oro *et al.*, 2014). La primera levadura descrita con estos atributos fue *Pichia guilliermondii* 87 aislada de manzanas, la cual se adhirió a las hifas de *B. cinerea* (Wisniewski *et al.*, 1991). Durante esta adhesión la β -(1-3) glucanasa degradaba las paredes celulares del patógeno. Más recientemente Izgu *et al.* (2011) investigaron que una *exo*- β -1,3 glucanasa llamada panomicocina consiguió reducir la concentración de esporas de *P. digitatum* y *P. italicum*.

En último lugar están las **proteasas**, las cuales son importantes factores de virulencia en hongos entomopatógenos y micoparásitos filamentosos. Estas enzimas están divididas a su vez en 4 grupos, serinproteasas, cisteína proteinasas, proteasa aspártica y metaloproteasas (Spadaro y Droby, 2016). Aunque dependiendo del tipo de proteasa que sea puede que reduzca la germinación de esporas o la longitud del tubo germinal. Además, el efecto inhibitor va a depender de la concentración de mohos patógenos en diferentes frutas (Freimoser *et al.*, 2019).

Este mecanismo, parasitismo y enzimas hidrolíticas, junto a otros como la formación de biofilm y competencia por el espacio y nutriente fue el propuesto por Bautista-Rosales *et al.* (2013) en la levadura *M. caribbica* L6A2 frente a *C. gloeosporioides*, causante en mango de la antracnosis. En la **Figura II.10** se observa cómo *M. caribbica* se une a las hifas, mientras que en el control negativo, *S. cerevisiae*, no ocurre.

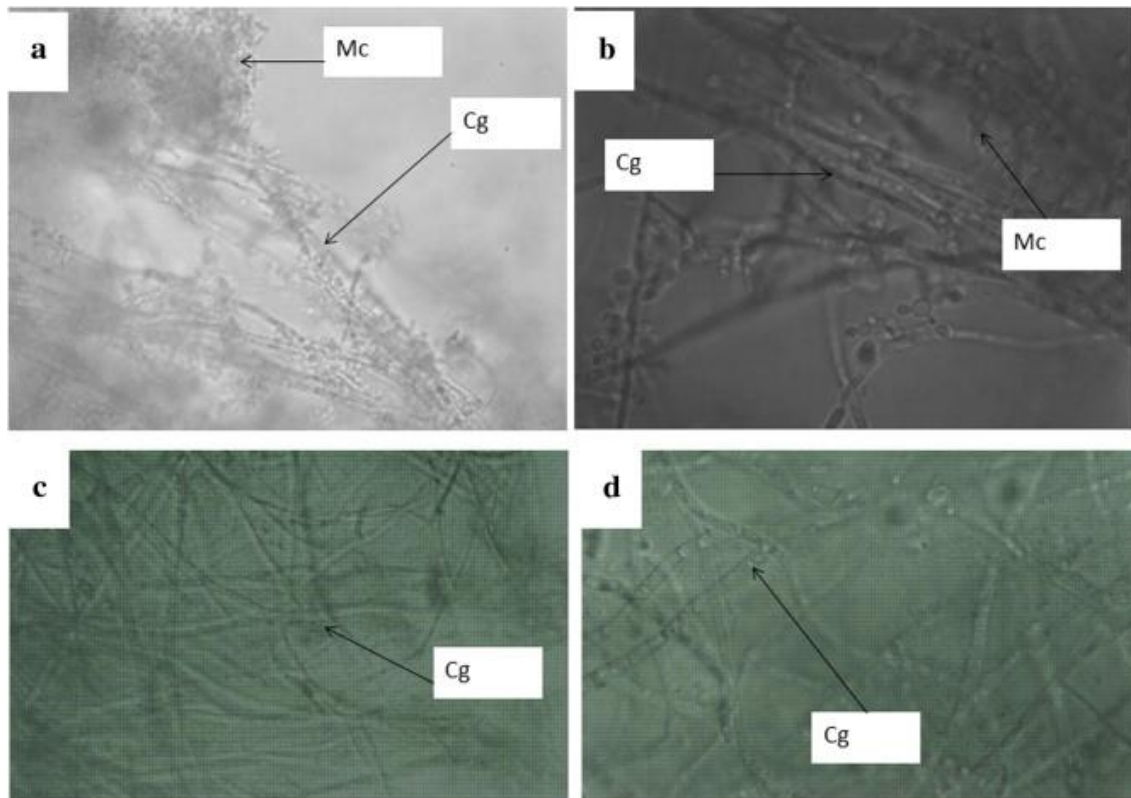


Figura II.10. Ejemplo de parasitismo entre levadura antagonista y patógeno fúngico. En la fotografía a (40x) y b (100x) la interacción entre *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) y *Meyeromyza caribbica* (MC) después de 48 h. En las imágenes c (40x) y d (100x) no se observa adhesión por el control negativo *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Bautista-Rosales *et al.*, 2013).

Este tipo de interacción a menudo es específica de ciertas especies, pueden producir una reducción de enfermedades en los ecosistemas. El inconveniente de este tipo de interacción es que es muy difícil explotarlo de manera comercial ya que la producción en masa del hiperparásito depende del micelio de hospedador vivo como sustrato (Köhl *et al.*, 2019).

II.3.5 Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Los VOCs pueden derivar de diferentes vías biosintéticas, por lo que para describir su gran complejidad química se ha empleado el término “**volatiloma**” (Maffei *et al.*, 2011). Estos compuestos pueden tener dos tipos de orígenes, por una parte, origen humano (refinación, evaporación de disolventes orgánicos, no quemados, etc.) y por otra parte pueden ser derivados de la propia naturaleza (emisiones de plantas, animales y microorganismos). La mayoría pertenecen a cinco grupos químicos: terpenoides, derivados de ácidos grasos, compuestos bencenoides, fenilpropanoides y derivados de

aminoácidos (Delory *et al.*, 2016; Dudareva *et al.*, 2013). Estos incluyen una gran cantidad de clases moleculares, hidrocarburos, alcoholes, tioalcoholes, aldehídos, cetonas, tioésteres, ciclohexanos, compuestos heterocíclicos, fenoles y derivados de benceno (Morath *et al.*, 2012).

La capacidad de control biológico de **algunas cepas de levadura antagonistas** se ha atribuido, al menos en parte, a la producción de VOCs (Farbo *et al.*, 2018). Estos compuestos, son de bajo peso molecular (<300 Da), tienen una baja polaridad y alta presión de vapor (Parafati *et al.*, 2017). Su mayor o menor actividad antifúngica suele depender del moho diana (Mari *et al.*, 2012^a). El análisis microscópico electrónico de las hifas de mohos expuestas a los diferentes VOCs puede mostrar muchas anomalías morfológicas, como la alteración de las vacuolas, la permeabilidad de la membrana o el aumento del tamaño de las hifas, lo que conlleva una germinación pobre de conidios y formación de apresores (Li *et al.*, 2012). Los VOCs podrían considerarse como antimicrobianos ideales, ya que el contacto entre el agente de biocontrol y el patógeno o entre el agente de biocontrol y los alimentos no es necesario para realizar su actividad (Contarino *et al.*, 2019). En la **Tabla II.8** se muestra levaduras antagonistas en la cuales su capacidad antifúngica, entre otros mecanismos, se ha asociado a la producción de VOCs.

Introducción general

Tabla II.8. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) antifúngicos producidos por levaduras. (Elaboración propia).

VOC	Levadura antagonista	Moho diana	Referencia
1,3,5,7-ciclooctatetraeno, 3- metil-1-butanol, 2- nonanona y feniletíl alcohol, 2-etil-1-hexanol	<i>Candida intermedia</i> C410	<i>Botrytis cinerea</i>	Huang <i>et al.</i> , 2011
2-feniletanol	<i>Cyberlindnera jadinii</i> 273, <i>Candida friedrichii</i> 778, <i>Candida intermedia</i> 235, <i>Lachancea thermotolerans</i> 775 y <i>Pichia anomala</i> WRL-076	<i>Aspergillus carbonarius</i> MPVA566, <i>Aspergillus ochraceus</i> MPVA70, <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357 y <i>Monascus purpureus</i>	Farbo <i>et al.</i> 2018; Fiori <i>et al.</i> 2014; Hua <i>et al.</i> , 2014; Tilocca <i>et al.</i> 2019; Zhang <i>et al.</i> , 2021
2-metil-1-butanol, 3- metil-1-butanol, fenetil alcohol y 2-metil-1- propanol	<i>Aureobasidium pullulans</i> L1 y L8	<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium spp.</i>	Di Francesco <i>et al.</i> , 2015
3-metil-1-butanol y 2- metil-1-butanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CR-1	<i>Phyllosticta citricarpa</i> IP-92	Toffano <i>et al.</i> 2017
Ácido acético, ácido octanoico, propionato de etilo, acetato de n- propilo, acetato de 2- metilbutilo, acetato de furfurilo, acetato de fenilmetilo, acetato de 2-feniletilo	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 793	<i>Botrytis cinerea</i> CECT205	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> 2020
Ácido helvólico	<i>Pichia guilliermondii</i> Ppf9	<i>Magnaporthe oryzae</i> P131	Zhao <i>et al.</i> , 2010
alcohol β feniletílico	<i>Debaryomyces neipalensis</i> JN942654	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2018
Etil-acetato	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> LCF135	<i>Penicillium roqueforti</i> DPPMAF	Coda <i>et al.</i> , 2013
Etil-acetato	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Disva 2, <i>Metschnikowia pulcherrima pulcherrima</i> Disva 267 y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Disva599	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , y <i>Colletotrichum spp</i>	Oro <i>et al.</i> , 2018
No identificado	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> BS91, <i>Metschnikowia pulcherrima</i> MPR3, <i>Aureobasidium pullulans</i> P11, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BCA61, <i>Candida sake</i> 41E, <i>Lachancea thermotolerans</i> , <i>D. hansenii</i> KI2a, MI1	<i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Penicillium italicum</i> , <i>Alternaria alternata</i> CBS916.96, <i>Alternaria tenuissima</i> CBS 124.277, <i>Alternaria arborescens</i> CBS f102.605, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Monilia fructigena</i> 2138 y <i>Monilia fructicola</i>	Arrarte <i>et al.</i> 2017, Di Francesco <i>et al.</i> , 2015, Grzegorzcyk <i>et al.</i> 2017 Parafati <i>et al.</i> , 2017, Zeidan <i>et al.</i> 2018,

La producción de VOCs ha sido descrita en la literatura en numerosas especies de levaduras antagonista (Contarino *et al.*, 2019). Por ejemplo, Chen *et al.* (2018) aislaron 918 cepas de levaduras de diversas fuentes, entre las cuales una cepa de *Galactomyces candidum* mostró una destacada capacidad de producir VOCs antifúngicos en fresas contra *B. cinerea*. Otras levaduras con capacidad para controlar a *B. cinerea* mediante la producción de VOCs *in vitro* e *in vivo* han sido *Candida intermedia* C410 (Huang *et al.*, 2011) y *Hanseniaspora uvarum* L793 (Ruiz-Moyano *et al.*, 2020). Igualmente, VOCs producidos por cepas de las levaduras *Wickerhamomyces anomalus*, *M. pulcherrima*, *A. pullulans* y *S. cerevisiae*, entre los que se encuentra principalmente los alcoholes (alcohol etílico, 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico) y ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo), se han asociado al control *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum* (Contarino *et al.*, 2019; Di Francesco *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2011; 2012). Levaduras productoras de VOCs también han mostrado potencial en controlar mohos toxigénicos en diferentes matrices vegetales. *Candida nivariensis* DMKU-CE18 redujo el crecimiento de *A. flavus* en un 64,9% y la producción de aflatoxinas en un 78,4% en granos de maíz, siendo el principal compuesto 1-pentanol (Jaibangyang *et al.*, 2020). Por otro lado, cepas productoras de VOCs como *H. uvarum* L793 y *H. opuntiae* L479 consiguieron reducir de manera significativa tanto el crecimiento como la producción de aflatoxinas de *A. flavus* (Tejero *et al.*, 2021). Además, en el trabajo de Galván *et al.* (2022) en un ensayo realizado en higos secos tanto *in vitro* como *in vivo* demostró la capacidad de reducción de crecimiento, germinación de los mohos y producción de toxinas por parte de *A. flavus* y *A. niger*, por parte de dos compuestos, acetato de furfurilo y 2-fenil acetato producidos por estas especies de *Hanseniaspora*.

Por otro lado, los VOCs también han mostrado ser eficaces en el control de mohos alterantes de alimentos de origen animal. Concretamente, Núñez *et al.* (2015) mostraron que la levadura *D. hansenii* 253H y 226G, aislada de jamón curado es activa contra *P. verrucosum*, responsable de la descomposición de este tipo de alimento. Esta levadura producía 2-metil-1-butanol y otros volátiles, con actividad antifúngica frente a *P. verrucosum*. Resultados similares frente a este moho fueron obtenidos *K. marxianus* QKM-4 aislada de un producto lácteo mediante la producción de diferentes alcanos de cadena larga (Alasmar *et al.*, 2010). Además, los VOCs producidos por esta levadura limitaban el crecimiento y producción de micotoxinas de *F. oxysporum* y *A. carbonarius*

Introducción general

en matrices vegetales. En kéfir, cepas de *S. cerevisiae* (Sc 9B) y *P. kudriavzevii* (Pk20 y Pk27) generaron compuestos orgánicos volátiles capaces de reducir significativamente el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Moure *et al.*, 2022).

Un factor para tener en cuenta en este tipo de mecanismo es el hecho de que tales compuestos a las concentraciones aplicadas **no afecten a las propiedades sensoriales** de los alimentos, siendo por tanto relevante su estudio previamente a su aplicación industrial. En este sentido, Coda *et al.* (2011; 2013) mostraron que levaduras con capacidad de producir VOCs pueden ser aplicadas en el control de *P. roqueforti* en la producción de pan. La aplicación del consorcio formado por *Meyerozyma guilliermondii* LCF1353, *W. anomalus* 1695 y *Lactobacillus plantarum* 1A7, las cuales producen acetato de etilo y una β -1,3-glucanasa durante la fermentación de la masa, fueron eficaces para prevenir la contaminación fúngica de las rebanadas de pan sin afectar negativamente a las propiedades sensoriales del pan (Coda *et al.*, 2013). Por lo tanto, levaduras con potencial de producir VOCs pueden ser una herramienta adecuada en el control de alterantes fúngicos.

II.3.6 Producción de toxinas

Las levaduras no son conocidas como productoras prolíficas de metabolitos secundarios, lo cual es una de las razones por las que a menudo plantean menos problemas de bioseguridad. En consecuencia, se han descrito relativamente pocas moléculas tóxicas que puedan contribuir a la actividad de biocontrol (**Tabla II.9**). La **floculosina** es un lípido de celobiosa de bajo peso molecular producido por la levadura *Pseudozyma flocculosa* (Mimee *et al.*, 2005; 2009^a; 2009^b; Teichmann *et al.* 2011). *Aureobasidium pullulans* produce **diversos polímeros** como pululano, exopolisacárido similar al aubasidano y poli (β - L-ácido málico), lípidos, compuestos volátiles, enzimas y metabolitos secundarios. Algunos de estos **metabolitos** como las aureobasidinas, liamocinas, ácido 2-propilacrílico, ácido 2-metilensuccínico, etc. confieren actividad antagónica frente a diversas bacterias y hongos (Prasongsuk *et al.*, 2018; Price *et al.*, 2015; 2017; Takesako *et al.*, 1991; Zain *et al.*, 2009). La producción de toxinas proporciona una ventaja competitiva a *A. pullulans* en condiciones oligotróficas secas, mientras que no muestra ningún efecto adicional, en comparación con las levaduras que no producen toxinas, sobre la actividad antagónica en ambientes más húmedos (McCormack *et al.*, 1995). Las toxinas más prominentes producidas por muchas cepas de

levadura de biocontrol son las denominadas **toxinas killer o también denominadas micocinas**, las cuales son toxinas extracelulares de naturaleza proteica con actividad frente a bacterias, hongos y protozoos (Nascimento *et al.*, 2020). En la **Tabla II.9** se muestran las especies de levaduras con capacidad de producir toxinas con capacidad antifúngica.

Estas proteínas se identificaron originalmente en *S. cerevisiae* y actúan principalmente frente a especies de levaduras competidoras (Lukša *et al.*, 2015; Schmitt y Breinig, 2006). Por lo tanto, las toxinas killer han sido estudiado principalmente con respecto al control de las levaduras alterantes en la industria de bebidas y alimentos o para aplicaciones médicas (Chessa *et al.*, 2017; Chi *et al.*, 2010; Lowes *et al.*, 2000; Mannazzu *et al.*, 2019; Schmitt y Breinig, 2002). Sin embargo, varias de estas toxinas también inhiben a hongos fitopatógenos y, por lo tanto, también algunas de ellas han mostrado su potencial para el control de mohos alterantes en fruta (Aloui *et al.*, 2015; Çorbacı y Uçar, 2018; Da Cunha *et al.*, 2018; Liu *et al.* 2015; Marquina *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2016). Sin embargo, se requieren más investigaciones para evaluar la especificidad de las toxinas de levadura y sus efectos sobre otros microorganismos beneficiosos, por ejemplo, en la microbiota del suelo, en la microbiota de productos fermentados, en la microbiota intestinal, etc., previamente a su aplicación industrial.

Introducción general

Tabla II.9. Tipos de toxinas y especies de levaduras productoras (Adaptada de Freimoser *et al.*, 2019).

Tipo de toxina	Levadura productora	Bibliografía
Toxina killer	<i>Candida guilliermondii</i> P3	Coelho <i>et al.</i> , 2009
	<i>Candida nodaensis</i> PYCC	Da Silva <i>et al.</i> , 2008
	<i>Debaryomyces hansenii</i> TEM8, TEM17, Dh-34, CYC 1021	Banjara <i>et al.</i> , 2016; Çorbacı y Uçar, 2018; Marquina <i>et al.</i> , 2001; Santos <i>et al.</i> , 2002
	<i>Debaromyces robertsiae</i> CBS6693	Klassen <i>et al.</i> , 2004
	<i>Kluyveromyces siamensis</i> HN12-1	Buzdar <i>et al.</i> , 2011
	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> DBVPG 6077	Comitini y Ciani, 2011
	<i>Mrakia frigida</i> 2E00797	Hua <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pichia acaciae</i> NRRL Y-18665	Klassen <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pichia anomala</i> DBVPG 3003, YF07b	De Ingeniis <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2007
	<i>Pichia farinosa</i> KK1	Suzukis y Nikkuni, 1994
	<i>Pichia kudriavzevii</i> RY55	Bajaj <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pichia kluyvery</i>	Parafati <i>et al.</i> , 2022
	<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106, CYC 1086	Belda <i>et al.</i> , 2017; Santos y Marquina, 2004a; 2004b; Santos <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pichia ohmeri</i> 158	Coelho <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> VKM Y-2190	Golubev <i>et al.</i> , 2006
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ACB-CR1, ACB-KD1, ACB-CAT1, ACB-BG1, ACB-K1, ACB-PE2, IFST062013	Fakruddin <i>et al.</i> , 2017; Lopes <i>et al.</i> , 2015; Rodríguez-Cousiño <i>et al.</i> , 2011
	<i>Saccharomyces paradoxus</i> AML-15-66	Vepštaitė-Monstavičė <i>et al.</i> , 2018
	<i>Schwanniomyces occidentalis</i> ATCC 44252	Chen <i>et al.</i> , 2000
	<i>Torulaspora delbrueckii</i> K barr-1, NPCC 1033	Ramirez <i>et al.</i> , 2015; Villalba <i>et al.</i> , 2016
	<i>Tetrapisispora phaffi</i> DBVPG 6076,	Chessa <i>et al.</i> , 2017; Comitini <i>et al.</i> , 2004; Comitini <i>et al.</i> , 2009
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	Guo <i>et al.</i> 2013	
<i>Williopsis saturnus</i> DBVPG 456, MUCL 41968, WC91-2	Buzzini <i>et al.</i> , 2004; Guyard <i>et al.</i> , 2002a; 2002b; Wang <i>et al.</i> , 2012	
<i>Williopsis mrakii</i> IF00895, LKB 169	Kasahara <i>et al.</i> , 1994a; 1994b; Lowes <i>et al.</i> , 2000	
<i>Zygoascus hellenicus</i>	Parafati <i>et al.</i> , 2022	
<i>Zygosacharomyces bailii</i> 412	Weiler y Schmitt, 2003	
Floculosina	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Mimee <i>et al.</i> , 2005; 2009 ^a ; 2009 ^b Teichmann <i>et al.</i> , 2011
Aureobasidinas	<i>Aureobasidium pullulans</i> R106	Takesako <i>et al.</i> , 1991
2-ácido propilacrílico, 2-ácido metileno succinico	<i>Aureobasidium pullulans</i> WH9	Zain <i>et al.</i> , 2009
Liamocina	<i>Aureobasidium pullulans</i> NRRL 50380	Price <i>et al.</i> , 2017
Toxinas no definidas	<i>Tilletiopsis</i> sp.	Urquhart y Punja, 2002

II.3.7 Quorum quenching y quorum sensing

El término “quorum sensing” se define como el proceso de comunicación de célula a célula a través del cual las células individuales pueden regular su fenotipo en respuesta a la concentración extracelular de moléculas de detección del “quorum”. Esta regulación se logra mediante la secreción de las moléculas de detección del quorum en el medio ambiente, de modo que puedan unirse a sus proteínas sensoriales objetivo y, por lo tanto, afectar directa o indirectamente la transcripción y traducción celular.

Al igual que en las bacterias, **las moléculas de detección del “quorum” (QSM) se relacionan con la formación de biopelículas y la virulencia** en levaduras. Por ejemplo, se ha demostrado que el “quorum sensing” coordina la expresión génica en varias levaduras como *Cryptococcus neoformans* (24067, B3501 y Cap67), *H. uvarum* (ZIM 670), *S. cerevisiae* (ZIM 1927) y otras (Albuquerque *et al.*, 2013; Hogan, 2006a; 2006b; Homer *et al.*, 2016; Pu *et al.*, 2014; Zupan *et al.*, 2013), sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado sobre *Candida albicans* y la regulación de su conversión de levadura en micelio a través del alcohol sesquiterpénico farnesol (Albuquerque y Casadevall, 2012; Lu *et al.*, 2014; Greguš *et al.*, 2010; Hornby *et al.*, 2001; Nickerson *et al.*, 2006).

Las QSM se pueden encontrar un gran número de metabolitos diferentes, pero para ser consideradas este tipo de moléculas tienen que cumplir **una serie de requisitos**. Como indican Albuquerque y Casadevall (2012), Diggle *et al.* (2007), March y Bentley (2004), Monds y O'Toole (2009) y Winzer *et al.* (2002), estos comprenden los siguientes:

1. Un QSM se **secreta y se acumula** en el entorno extracelular y está disponible para otras células. Otro criterio que a veces se incluye aquí es que la producción de un QSM ocurre durante etapas específicas de crecimiento, bajo ciertas condiciones fisiológicas o en respuesta a ciertos cambios ambientales.
2. Existen **mecanismos para detectar y responder específicamente** a un QSM. Aquí, Winzer *et al.* (2002) afirmó que un QSM debería ser reconocido por un receptor específico, mientras que Monds y O'Toole (2009) encontraron que estos criterios eran demasiado difíciles de cumplir, ya que, en algunos casos, las células transfieren un QSM a la célula y lo perciben como una concentración intracelular.

Introducción general

3. Un QSM no es tóxico en el rango de concentración que se requiere para provocar la respuesta definida.
4. **La respuesta** provocada por un QSM **debe distinguirse del metabolismo primario** del QSM. Por lo tanto, la respuesta celular a un QSM se extiende más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o desintoxicar el QSM.
5. Un **QSM purificado puede reproducir la respuesta biológica** a una concentración fisiológicamente relevante. Es importante que un QSM purificado pueda provocar la respuesta biológica definida en concentraciones reales.
6. La red de señales afectada por un QSM es adaptativa a nivel de la comunidad. Por lo tanto, para ser considerado un QSM, un compuesto **debe promover una reacción en una población de células** que sea distinta de la forma en que las células se comportarían individualmente.
7. La acumulación de un QSM genera **una respuesta concertada** una vez que se ha alcanzado un umbral crítico de concentración, es decir, el “quórum”. Albuquerque y Casadevall (2012) también indicaron que la concentración de QSM debería ser proporcional a la densidad celular de la población.
8. Un QSM **no es únicamente un subproducto del catabolismo fúngico**.

En este sentido, se han investigado diferentes compuestos que consiguen inhibir la producción de otros metabolitos secretados por mohos como puede ser el **ácido penicílico** procedente de *Penicillium radicum*, o la **patulina** procedente de *Penicillium coprobium* (Padder *et al.*, 2018; Sharma y Jangid, 2014). A estos compuestos se les denomina **inhibidor de detección de quorum (QSI)**.

Otro compuesto como el **Farnesol**, un metabolito secundario excretado por muchas levaduras dimórficas, actúa como un QSI (Mehmood *et al.*, 2019). Esto también es conocido como **“quorum quenching”** o extinción del “quorum”, proceso en el que se interrumpe las señales del “quorum sensing” utilizando varias formas que incluyen la destrucción enzimática de las moléculas de señal, el desarrollo de anticuerpo o mediante agentes bloqueadores de moléculas de señalización del “quorum sensing” (Ghani *et al.*, 2014). Los microorganismos con este tipo de proceso de comunicación tienen un amplio espectro de potencial antimicrobiano, por ejemplo, *F. graminearum*, especies de *Candida no albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *C. neoformans* (Cordeiro *et al.*,

2015; Costa *et al.*, 2012; Sardi *et al.*, 2014; Wongsuk *et al.*, 2016). En el caso de *A. fumigatus*, el farnesol alteró la vía de señalización relacionada con la integridad de la pared celular, lo que condujo aún más a la mala localización de la proteína Rho que alteró la proliferación de la morfología de las hifas (Dichtl *et al.*, 2010).

II.3.8 Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Una de las respuestas de defensa más tempranas y destacadas por los agentes de biocontrol es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Luo *et al.*, 2013; Mittler, 2002; Zeng *et al.*, 2010), como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (-OH). Estas moléculas son bien conocidas por su participación en varios mecanismos de defensa que pueden dirigirse directamente a los patógenos o limitar indirectamente la infección al inducir la expresión génica defensiva y reforzar la pared celular de la planta (Movahedi *et al.*, 2022). Macarisin *et al.* (2010) propone un nuevo punto de vista para los ROS, como es su uso en postcosecha en frutas cítricas y manzanas. Su estudio indica que *M. fructicola* y *C. oleophila*, que son levaduras con una gran capacidad formadora de H_2O_2 en las heridas de la fruta, deduciendo así, que estas levaduras inducían una respuesta oxidativa en la fruta. En otro estudio posterior, se observó también como la levadura *P. membranaefaciens* producía altos niveles del ion superóxido y peróxido en frutas contra la infección de *P. digitatum* (Luo *et al.*, 2013).

II.4 Microorganismos antagonistas patentados

Entre los microorganismos antagonistas utilizados como BCA contra mohos patógenos postcosecha se han caracterizado un número relativamente alto de levaduras y bacterias, esto está relacionado con sus características que las hacen efectivas como BCA en productos agrícolas frescos, así como en otros alimentos, aunque en productos de origen animal el número de levaduras y bacterias antagonistas caracterizadas es mucho menor. Esto provoca que estos microorganismos sean rentables a la hora de usarlos comercialmente, y han dado lugar a diferentes productos comerciales que tienen como principio activo levaduras antagonistas (**Tabla II.10**).

Tabla II.10. Ejemplos de productos de biocontrol/biopreservación registrados hasta 2018 que consisten en bacterias, levadura o hongos similares a la levadura como ingrediente activo (Pretscher *et al.*, 2018; Sellitto *et al.*, 2021).

Composición	Nombre producto	Patógenos diana	Alimento diana	Aplicación
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Boniprotect®	<i>Penicillium, Botrytis, Monilinia</i>	Fruta de pepita	Precosecha y postcosecha
<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade®	<i>Erysiphe necator, Uncinula necator, Plasmopara viticola</i> , podredumbre del peral y el manzano	Legumbres, frutas de pepita y cacahuetes	Precosecha y postcosecha
<i>Candida oleophila</i>	Aspire®	<i>Botrytis, Penicillium</i>	Frutas de pepita y cítricos	Postcosecha
<i>Candida sake</i>	Candifruit®	<i>Penicillium, Botrytis, Rhizopus</i>	Fruta de pepita	Postcosecha
BAL y levaduras	Hi Shield P®	Mohos, levaduras (<i>Pichia anomala</i>) y bacterias (<i>Bacillus subtilis</i>); (potenciador del sabor)	Utilizados en la industria alimentaria	Procesado de alimentos
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	MicroGard®	Bacterias, levaduras y mohos	Salsas, aderezos, embutidos, pastas panadería productos lácteos	Procesado de alimentos
<i>Lactobacillus paracasei</i>	FreshQ 5®	Levaduras y mohos	Requesón	Procesado de alimentos
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Holdbac YM-XPk®	Levaduras y mohos	Todo tipo de quesos	Procesado de alimentos
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FreshQ 2®	Levaduras y mohos	Requesón	Procesado de alimentos

<i>Metschnikowia fructicola</i>	Noli®	<i>Botrytis, Penicillium, Rhizopus, Aspergillus</i>	Fresa, fruta de hueso y pepita, boniato	Postcosecha
	Gaia®	<i>Botrytis y levaduras No-Saccharomyces alterantes</i>	Uva cosechada, uva pasa y mosto de uva	Procesado de alimentos y postcosecha
	Shermer®	<i>Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Penicillium expansum, Penicillium digitatum, Penicillium italicum y Rhizopus stolonifer</i>	Cítricos, fruta de hueso y frutas de pepita	Postcosecha
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Nymphaea®	<i>Botrytis y levaduras No-Saccharomyces alterantes</i>	Uva cosechada, uva pasa y mosto de uva	Procesado de alimentos y postcosecha

Para que un microorganismo pueda ser aplicado en alimentos, éste tiene que ser considerado inocuo para la salud humana. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) debe realizar una serie de pruebas a todos estos microorganismos antes de poder ser comercializados en Europa, por tanto, debe pasar por una evaluación de **QPS (presunción cualificada de seguridad)**, que se realiza cuando la EFSA recibe una solicitud de autorización de comercialización de un producto regulado que requiera una evaluación de seguridad.

Para obtener el estatus de QPS, un microorganismo debe cumplir los siguientes **criterios**:

- Su identidad taxonómica debe estar bien definida.
- Los conocimientos disponibles deben ser suficientes para determinar su seguridad.
- Debe establecerse y demostrarse la ausencia de propiedades patógenas.
- Debe describirse claramente su uso previsto.

Los microorganismos que no están bien definidos, con respecto a los que se han identificado ciertos problemas de seguridad o acerca de los que no es posible concluir si suponen un problema de seguridad para los seres humanos, los animales o el medio ambiente, no se consideran adecuados para obtener el estatus de QPS y deben someterse a una evaluación de la seguridad completa (EFSA, 2020).

Introducción general

Diversas levaduras están ya **integradas en la lista QPS**, procedentes de diferentes alimentos, como *D. hansenii*, *H. uvarum* o especies del género *Kluyveromyces*, por ejemplo *K. lactis* y *K marxianus*. Estas cuatro levaduras han recibido la calificación de no tener resistencia a los antimicóticos utilizados para el tratamiento médico de las infecciones por levaduras en los casos en que se agregan células viables a la cadena alimentaria o alimentaria. Otras especies de levaduras han recibido otro tipo de calificación. Esta calificación se aplica a “solo con fines de producción” (la calificación 'solo con fines de producción' implica la ausencia de células viables del organismo de producción en el producto final) y también se puede aplicar para alimentos y piensos. Concretamente, en esta última calificación se incluyen las especies *Cyberlindnera jadinii* (*Pichia jadinii*) o *S. cerevisiae* (EFSA, 2022).

La EFSA además ha actualizado en marzo de 2022 una lista sobre microorganismos considerados QPS, en la cual hay un total de 1.155 microorganismos considerados QPS. Esta lista de microorganismos comprende bacterias, bacteriófagos, mohos, oomycetos, algas, virus y levaduras. En este último grupo hay un total 23 levaduras propuestas para diferentes usos, como *A. pullulans* DSM 14940 y DSM 14941, *C. oleophila*, *M. fructicola* NRRL Y-27328 y *S. cerevisiae* LAS02; estas cinco cepas son utilizadas para la protección de plantas. También hay otras cepas usadas como se puede observar en la **Tabla II.11**.

Tabla II.11. Cepas de levaduras aprobadas para su uso en alimentos por la EFSA. (EFSA,2022).

Levadura	Cepa	Area de utilización
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DS 00332 (parental strain)/DS 38549/KLA	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 14940 y DSM 14941	Productos para proteger plantas
<i>Candida cylindracea</i>	LAYH (GMM)	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Candida glabrata</i>		Aditivos alimentarios
<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC 20474	Aditivos alimentarios
<i>Candida oleophila</i>		Productos para proteger plantas
<i>Candida rugosa</i>	AE-LAY	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Eremothecium ashbyii</i>	CCTCCM 2019833	Aditivos alimentarios
<i>Hamamotoa singularis</i>	YIT 10047	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AE-KL/CHY/CIN (GMM)	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	fragilis/ var. lactis K1	Aditivos alimentarios
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Po165	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Komagataella pastoris</i>	CECT 13094/CGMCC 12056/DSM 26643 /DSMZ 25376/DSMZ 26469/CGMCC 12056/CGMCC 12056/DSM 25376/DSM 26469/CGMCC 12056/CECT 13094	Aditivos alimentarios
<i>Komagataella pastoris</i>		Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Komagataella phaffii</i>	MXY0541	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Komagataella phaffii</i>	DSM 32159/NCAIM Y001485/DSM 33574/CGMCC 12056/DSM 32854/CECT 13171/DSM 23036/DSM 32159/DSM 32854/DSM 32854/GS1115-KI/CGMCC 7.370/CGMCC 7.371/NCAIM Y001485	Aditivos alimentarios
<i>Metschnikowia fructicola</i>	NRRL Y-27328	Productos para proteger plantas
<i>Ogataea angusta</i>	DP-Jza21 (GMM)/DP-Jzk33 (GMM)	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Ogataea angusta</i>		Aditivos alimentarios
<i>Cryptococcus laurentii</i>	AE-BLC (NITE SD 00411)	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Pichia pastoris</i>	(GMM)	GMO

Introducción general

<i>Pichia pastoris</i>	ATCC 76273/CBS 7435/ CECT 11047/ CECT 13094/DSM 23036/ DSM 23036	Aditivos alimentarios
<i>Pichia pastoris</i>	PRF (GMM) /UGT-a/UGT-b	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DS 67494/CNCM I-1077/CNCM I- 1079/CNCM I-1079/BCCM/MUCL 39885/CBS 493.94/CBS 615.94/CEN.PK113- 7D/CNCM I-1077/CNCM I-1079/CNCM I- 3060/CNCM I-3060/ NCYC R645/NCYC/LOCK 0141/MUCL 39885 R646/CNCM/CNCMI-3060 I-3399/CNCM I- 4407	Aditivos alimentarios
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CNCM I-3799	Sanidad
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LAS02	Productos para proteger plantas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC Sc 47 (CNCM I-4407)/NA	Aditivos alimentarios
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		GMO
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc 47/CNCM I-4407	Aditivos alimentarios
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ATCC 5233/ATCC SD 5233	Aditivos alimentarios
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>		Aditivos alimentarios
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	ATCC SD-5340	Aditivos alimentarios
<i>Yarrowia lipolytica</i>	(GMM)	Aditivos alimentarios
<i>Yarrowia lipolytica</i>	(GMM)	Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas
<i>Yarrowia lipolytica</i>	A-101	Nuevos alimentos
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		Enzimas alimentarias, aditivos alimentarios y aromas

II.5 Tendencias futuras

El futuro del biocontrol y la preservación tiende al uso de aquellas sustancias o fracciones de microorganismos antagonistas que tengan una clara actividad, eficaz contra el microorganismo alterante. En el caso del queso, la aplicación de dichas **levaduras autóctonas o sus fracciones activas** podrían utilizarse junto con un cultivo iniciador para la protección del queso durante la maduración y posterior comercialización de la alteración de mohos indeseables. Cada vez hay más productos que se comercializan como aditivos para este tipo de alimento.

Para ello, es necesario profundizar en los mecanismos de inhibición contra los mohos que tienen las levaduras que hemos estudiado en esta tesis, ya que en la mayoría de los casos no utilizan un solo mecanismo de acción sino un conjunto de ellos (Kohl *et al.*, 2019). Una herramienta muy interesante que podría ayudar a dilucidar los diferentes tipos de mecanismos empleados es el **uso de las “-ómicas”** tanto de dichas levaduras como de los mohos estudiados. Esto está en clara consonancia con la bibliografía publicada en los últimos años, ya que en los últimos 10 años se han publicado casi 1000 artículos en relación con el uso de las “-ómicas” en alimentos (Palabras clave: “biocontrol”, “food”, “omics” y “antifungal”), donde solo en 2022 se han publicado casi 300. La manipulación genética también es un procedimiento que puede tener sus frutos, ya que la inserción de genes de aprovechamiento de sustratos o de la liberación de ciertos compuestos puede ser útil a la hora de defenderse contra el microorganismo patógeno.

Por otro lado, también se podría explorar la combinación de microorganismos antagonistas junto con métodos físicos de control para que actúen sinérgicamente, puesto que como se ha resaltado anteriormente, el cepillado o el uso de presión reduce significativamente el crecimiento de microorganismos alterantes en los alimentos.

Por último, otro método que puede ser estudiado en el futuro, es la microencapsulación de los microorganismos con capacidad antagonista para una lenta liberación de estos, y así el alimento pueda estar protegido no solo durante el proceso de elaboración en el caso de productos de origen animal y durante la precosecha en los alimentos de origen vegetal, sino también durante su almacenamiento y posterior comercialización, teniendo así un potencial periodo de actuación más amplio.

OBJETIVOS

III. Objetivos

III.1 Objetivo General:

Investigar y desarrollar estrategias de biocontrol efectivas para la conservación y mejora de la calidad y apariencia de alimentos de origen vegetal y animal, mediante el uso de levaduras antagonistas, con un enfoque en la minimización del uso de fungicidas químicos y aditivos, garantizando la seguridad alimentaria y contribuir con la estrategia europea propuesta en el pacto verde de reducir las sustancias químicas externas en los alimentos.

III.2 Objetivos Específicos por Capítulo:

Capítulo 1: Evaluar la eficacia de levaduras procedentes de uva como agentes de biocontrol contra *Penicillium glabrum* en uvas, identificando cepas antagonistas mediante análisis *in vitro* e *in vivo* y caracterizando sus mecanismos de acción.

Capítulo 2: Investigar la combinación del envasado en atmósfera modificada pasiva (MAP) y levaduras antagonistas, específicamente *Metschnikowia pulcherrima* L672 y *Pichia kudriavzevii* PK18, en la extensión de la vida útil de las cerezas, comparando su eficacia con tratamientos fungicidas convencionales y evaluando su impacto en la calidad fisicoquímica y microbiológica.

Capítulo 3: Caracterización y evaluación del potencial como agentes de biocontrol de levaduras autóctonas de quesos contra mohos alterantes en quesos, analizando la influencia de las condiciones de maduración (temperatura, actividad de agua y pH) en su actividad antagonista, y determinando su efectividad tanto *in vitro* como *in vivo*.

Capítulo 4: Explorar levaduras autóctonas de quesos para controlar la pigmentación rosada causada por *Yarrowia lipolytica* en quesos tradicionales de leche cruda, evaluando su actividad killer a diferentes condiciones de pH, % de NaCl y temperatura y la capacidad para inhibir o limitar la alteración en diferentes condiciones de maduración del queso.

ESTRUCTURA EXPERIMENTAL

IV. Estructura experimental

Esta Tesis doctoral se divide en cuatro capítulos:

Capítulo 1: Evaluación de la capacidad antagonista de levaduras aisladas de viñedos para el control de mohos alterantes de uva.

Capítulo 2: Mejora de la vida útil de la cereza (*Prunus avium* L.) mediante la aplicación combinada de envasado en atmósfera modificada (MAP) y levaduras antagonistas para su exportación a larga distancia.

Capítulo 3: Control biológico de mohos alterantes en quesos de pasta blanda de Extremadura.

Capítulo 4. Levaduras con capacidad antagonista frente a otras levaduras alterantes y potencialmente patógenas aisladas de quesos de pasta blanda.

En la **Figura VI.1** se muestra el diseño experimental de esta Tesis doctoral, así como el objetivo general junto con los específicos de cada capítulo

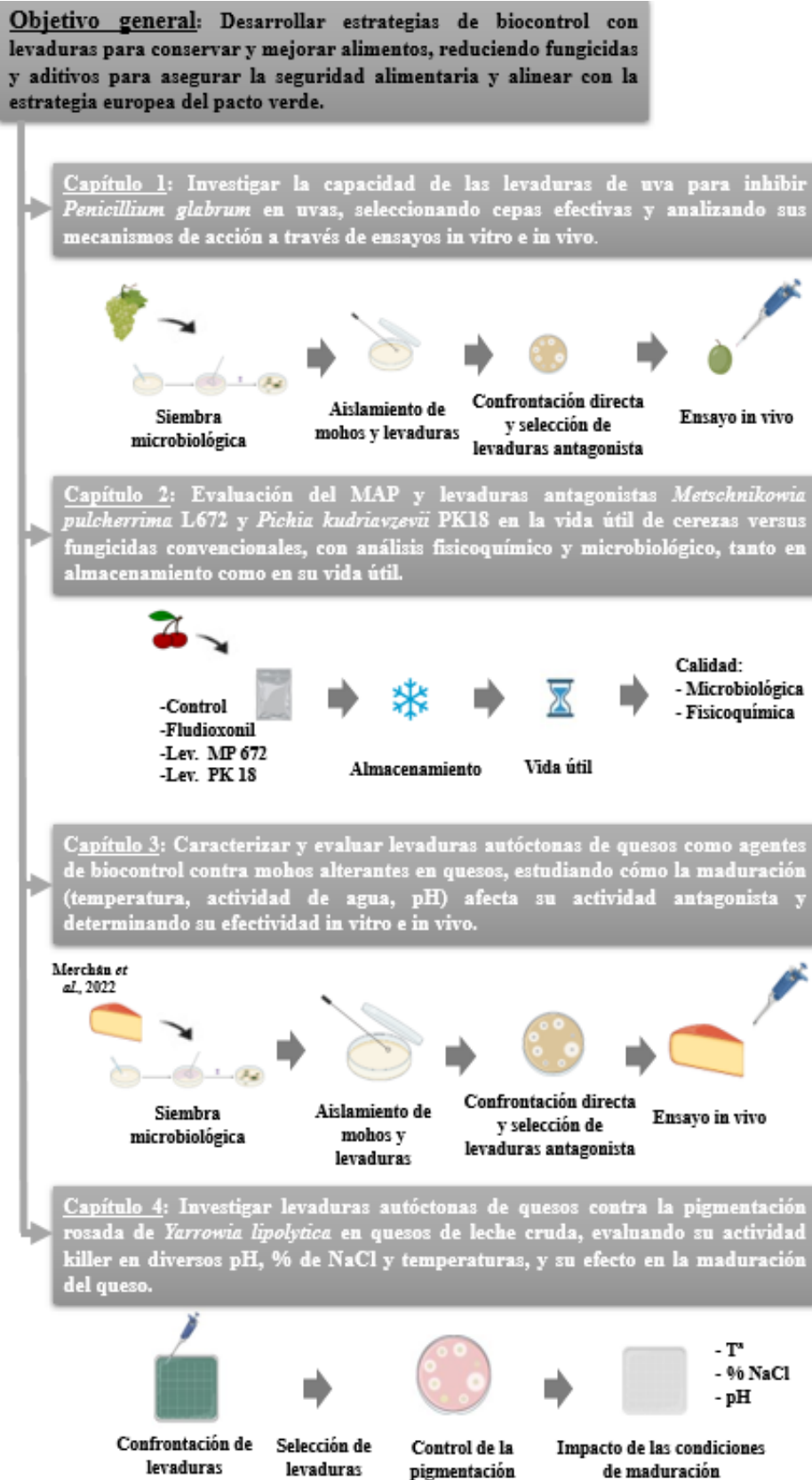


Figura IV.1. Diseño experimental de esta tesis doctoral, así como el objetivo general y los específicos de cada capítulo.

CAPÍTULO 1.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LEVADURAS AISLADAS DE VIÑEDOS PARA EL CONTROL DE MOHOS ALTERANTES DE UVA.

V. Capítulo 1. Evaluación de la capacidad antagonista de levaduras aisladas de viñedos para el control de mohos alterantes de uva.

V.1 Resumen

El biocontrol es una de las alternativas prometedora a los fungicidas sintéticos para la conservación de alimentos. *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus* sección *Nigri* están entre los patógenos más preocupantes para el mantenimiento de la calidad de la uva. Sin embargo, frecuentemente, otras especies, como *Penicillium glabrum* predominan en racimos dañados, como se muestra en este capítulo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antagonista de levaduras nativas de uva frente a *P. glabrum*. Para ello, inicialmente se evaluó el potencial antagonista de 54 aislados de levaduras obtenidos de viñedos mediante confrontación directa en placas de agar dextrosa de patata contra *P. glabrum*. Tres aislados, identificados como *Pichia terricola*, *Aureobasidium pullulans* y *Zygoascus meyeriae*, destacaron por su actividad antagonista *in vitro*. Sin embargo, *in vivo*, las confrontaciones en uvas dañadas mostraron discordancias con la confrontación directa *in vitro*. *P. terricola*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora viticola*, *Z. meyeriae* y *Hanseniaspora uvarum* redujeron significativamente la incidencia de *P. glabrum* en uvas. No obstante, *P. terricola*, *H. viticola* y *H. uvarum* por sí mismo causaban deterioro de las uvas en las heridas. Las inhibiciones observadas se asociaron con diferentes mecanismos como la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC), enzimas líticas, formación de biofilm y competencia por nutrientes. En base a estos resultados, los aislados con mayor potencia como agentes de biocontrol contra *P. glabrum* fueron *P. kudriavzevii* L18 (productora de VOC antifúngicos que inhibió completamente la incidencia de *P. glabrum*) y *Z. meyeriae* L29 (con actividad de pectinasa, quitinasa y β -glucanasa y formación de biofilm que redujo el 70% de la incidencia de *P. glabrum*).

V.2 Material biológico y diseño experimental

Para el desarrollo del presente capítulo se tomaron muestras en el año 2018 de un viñedo de la variedad "Pardina" (variedad blanca, *Vitis vinifera*) localizado en la localidad de Lobón (38°49'33.41" N; 6°37'34.78" W, Badajoz, España). Las condiciones climáticas de la zona se pueden apreciar en la **Figura V.1**. En el año de muestreo se alcanzó una temperatura máxima de 44,7 °C, y la precipitación anual acumulada fue de 488,6 mm (clasificación climática de Köppen = Csa). En el momento de la cosecha, se seleccionaron de forma aleatoria diez racimos de uva con signos de alteración y diez sanos. El muestreo se realizó en veinte plantas diferentes a través de dos transectos diagonales. Las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas en bolsa estériles y fueron transportadas en condiciones de refrigeración (<7 °C) hasta los laboratorios de los Institutos Universitarios de Investigación de la Universidad de Extremadura para su análisis microbiológico.

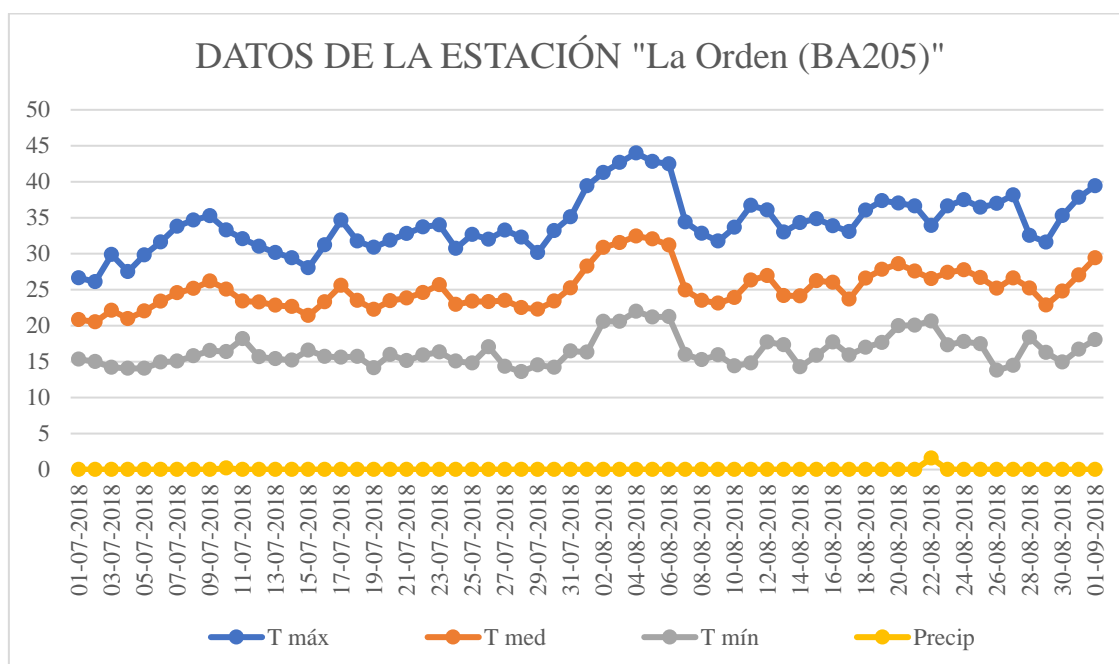


Figura V.1. Condiciones climáticas durante el crecimiento de la uva durante el año 2018, en él se pueden observar las temperaturas máximas, mínimas y medias expresada en °C, las precipitaciones expresadas en L/m². (<http://redarexplus.gobex.es>).

En la **Figura V.2** se muestra de forma esquemática el diseño experimental del capítulo 1. Brevemente, en primer lugar, se tomaron las muestras de uvas con y sin alteración, en las cuales se hicieron recuentos y asilamientos de levaduras en las uvas sanas y de mohos en las uvas con alteración. Los mohos y levaduras aislados fueron identificados mediante biología molecular. Finalmente, se estudió la capacidad antagonista *in vitro* e *in vivo* de las levaduras identificadas frente a los principales mohos causantes de alteración en las muestras de uvas.

Material biológico y diseño experimental

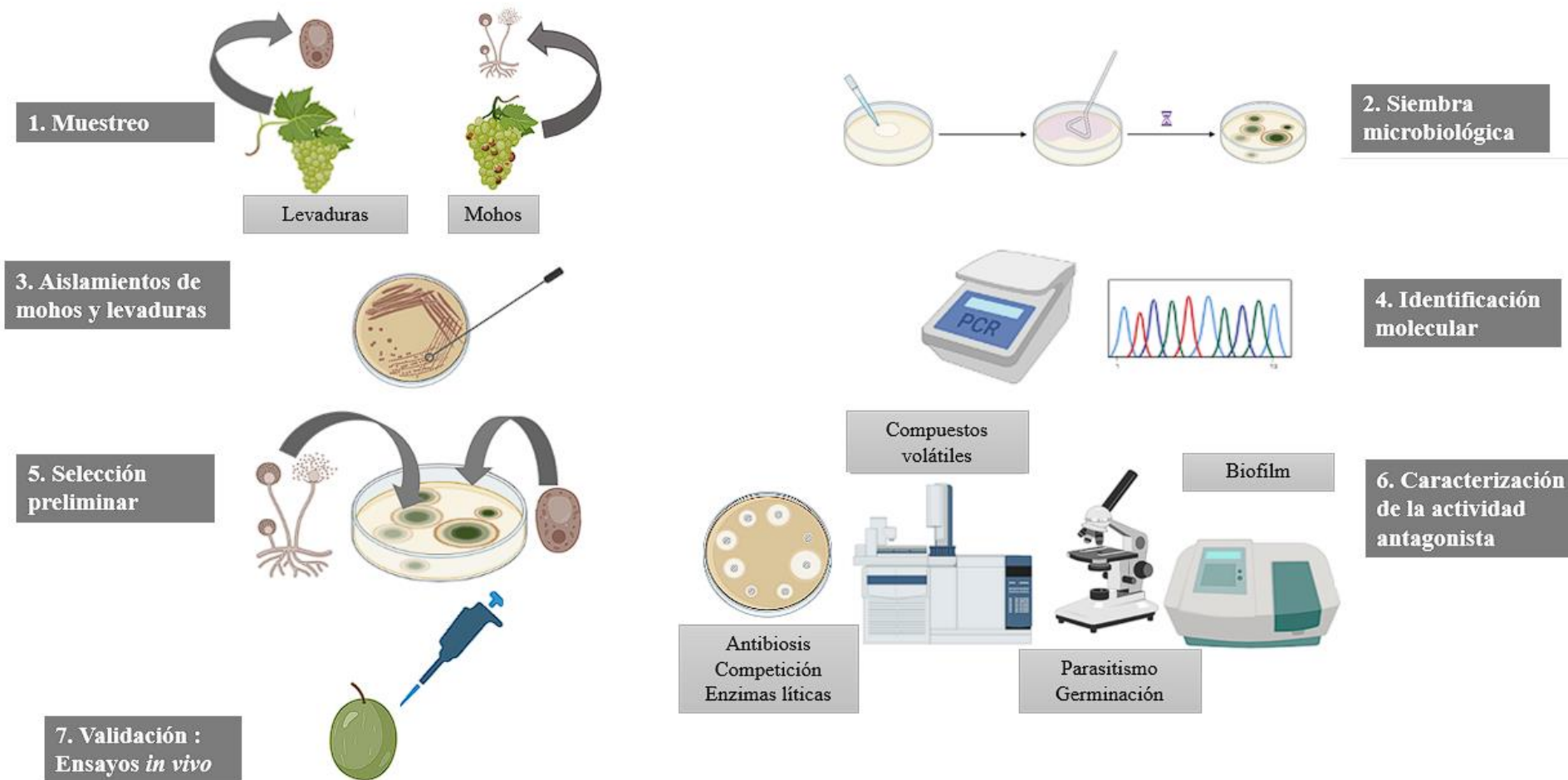


Figura V.2. Esquema general del diseño experimental que se siguió durante el desarrollo del Capítulo 1 (Elaboración propia).

V.2.1 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se realizó en un periodo no superior a 24 h después de la toma de muestras. Para el desarrollo de este se tomaron y pesaron de forma aséptica aproximadamente 25 gramos de muestra que se diluyó decimalmente con agua de peptona 0,1% (p/v) en una bolsa Stomacher. Tras la homogenización de la mezcla en un Stomacher, Lab Blender 400, (Seward Medical, Londres, UK) se procedió a hacer diluciones decimales seriadas con agua de peptona 0,1% en tubos de 9 mL. Los tubos de las diluciones se homogeneizaron mediante agitación en un Vortex. A continuación, se sembró 0,1 mL de cada dilución en superficie en agar de dextrosa de patata (PDA, Pronadisa) acidificado para el recuento de mohos y levaduras. Posteriormente, se extendió la cantidad sembrada por toda la superficie de forma homogénea con un asa de digralsky. Una vez sembradas todas las muestras en las placas, las placas de agar PDA se incubaron a 25°C durante 96 h. Las placas que contenían entre 30 y 300 colonias se utilizaron para el recuento de los diferentes microorganismos estudiados. El análisis microbiológico fue realizado en triplicado por cada muestra. Los resultados obtenidos se expresaron en logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (\log_{10} ufc g^{-1}).

V.2.2 Aislamiento de mohos y levaduras

El aislamiento de levaduras y mohos de las placas de agar PDA se realizó en base a las características morfológicas de las colonias en las diluciones más altas. Dos colonias de una misma morfología fueron seleccionadas y sembradas en agar PDA por agotamiento discontinuo para las levaduras y en el centro de la placa para los mohos, hasta obtener cultivos puros. Posteriormente, se procedió a almacenar los cultivos puros a -80°C. Para ello, con un asa de simbra se tomó material biológico del cultivo puro de cada levadura y se resuspendió en un criotubo que contenía glicerol al 40 % (v/v). En relación con los cultivos puros de mohos, una vez esporulados, se añadieron 5 mL de una solución de Tween 80 (agente tensoactivo, que ayuda a que los conidios estén más disueltos) al 0,05% (v/v) esterilizada. Posteriormente, con ayuda de un asa de siembra de digralsky se procedió a raspar suavemente la colonia. Finalmente, se tomaron 700 μ L de la solución de esporas de la superficie de la placa de agar PDA que se mezclaron (1:1) en un criotubo junto con una mezcla de glicerol al 80% (v/v). Finalmente, los criotubos conteniendo las

Material biológico y diseño experimental

levaduras aisladas o las esporas de cada aislamiento de moho fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

V.2.3 Identificación molecular a nivel de especie de los aislados de levaduras y mohos

En primer lugar, a partir de los cultivos almacenados a -80°C se crecieron las levaduras aisladas en agar YPD durante 48 h a 25°C y los mohos aislados en agar PDA a 25°C durante 7 días. Posteriormente, se procedió a la extracción del DNA genómico a partir de una cantidad suficiente de material biológico de cada aislado mediante la utilización del kit comercial NucleoSpin® Microbial DNA kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad y calidad de los ADN extraídos se evaluó en un espectrofotómetro de UV visible Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, EUA). La concentración de los ADN fue ajustada a $10\text{ ng}/\mu\text{L}$.

Tras la extracción del ADN, se procedió a la identificación de los aislados mediante la amplificación por PCR del marcador genético ITS (espaciador transcrito interno: ITS1/ITS2-5,8S rRNA) utilizando la pareja de cebadores (ITS1-ITS4) descrita por White *et al.* (1990). Las concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la PCR se indican en la **Tabla V.1**. Los reactivos utilizados para la PCR fueron de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (San José, CA, EUA). Las reacciones de la PCR fueron realizadas en un termociclador T100™ thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando una desnaturalización inicial de 94°C durante 4 min., seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, hibridación durante 1 min a 55°C y una elongación de 72°C durante 1 min, y una extensión final de 72°C durante 10 min.

Tabla V.1. Concentración de los reactivos utilizadas en la PCR de la región ITS.

Reactivos concentración inicial	Reactivos concentración final	Volumen de reactivos en 1 reacción (50 μl)
Cebador ITS1 10 μM	0,125 μM	1,25 μL
Cebador ITS4 10 μM	0,125 μM	1,25 μL
DNTP 10 MM	0,2 mM	1 μL
Buffer 10X	1x	5 μL
Taq Polimerasa 5 u/μL	5 unidades/ μL	0,25 μL
H₂O estéril biología molecular	40,25 μL	40,25 μL
ADN	10 ng/ μL	1 μL

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (agarosa al 1% p/v; Nippom-Genetics) teñido con Midori Green Advance (Nippon, Japan). En la preparación de los geles y desarrollo de la electroforesis se utilizó como tampón de carrera TAE 1X. Este se elaboró disolviendo 20 mL de TAE 50X pH 8,5 a 20°C (EDTA Na₂ 2H₂O: 18,61 g/L (0,05 M), ácido acético: 60,05 g/L (1 M) Tris: 242,28 g/L (2 M); en 980 mL de agua desionizada. El marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EUA) fue utilizado como referencia en la electroforesis. Seguidamente, la visualización de los productos de PCR obtenidos se llevó a cabo por el transiluminador Azure Biosystems c200. Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando un kit comercial de purificación GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher-Scientific) y fueron secuenciados por el Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia (STAB) de la Universidad de Extremadura (Badajoz). Las secuencias obtenidas fueron manipuladas con el programa informático Chromas Pro version 1.49 beta (Technelysium, Queensland, Australia). La identificación a nivel de especie se realizó comparando las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank usando el BLAST algorithm. La identificación de los mohos y levaduras aisladas a nivel de especie fue determinada sobre la máxima similitud.

La identificación de los aislados de mohos asociados a la alteración de las uvas fue confirmada mediante la amplificación adicional de los marcadores genéticos 26S (subunidad grande del ribosoma, LSU), β -tubulina y calmodulina utilizando las parejas de cebadores NL1-NL4, Bt2a-Bt2b y CMD5-CMD6 descritas por O'Donnell (1993), Glass y Donaldson (1995) y Hong *et al.* (2005), respectivamente. Las concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la PCR fueron los mismos indicados en la **Tabla V.1** para la región ITS. Las reacciones de la PCR fueron realizadas en un termociclador T100™ thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando una desnaturalización inicial de 94° C durante 4 min., seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, hibridación durante 1 min a temperatura variable según la pareja de cebadores (55°C para 26S y β -tubulina; 57°C para Calmodulina), una elongación de 72°C durante 1 min, y una extensión final de 72° C durante 10 min. La visualización de los productos de PCR y posterior purificación y secuenciación fue igual a como se ha descrito anteriormente para la región ITS.

Material biológico y diseño experimental

Adicionalmente, se realizó un tipado a nivel de cepa mediante ISSR-PCR (Inter simple sequence repeat) utilizando los marcadores (CAG)₄ (5'-ARRTYCAGCAGCAGCAG-3'), (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), UBC809 (5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'), y UBC817 (5'-CACACACACACACACAA-3'). Las concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la PCR fueron los mismos indicados en la **Tabla V.1** a excepción del cebador que para los ISSR-PCR se utilizó un único cebador a 0,25 µM. Las reacciones de la PCR fueron realizadas en un termociclador T100™ thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min., seguido de 40 ciclos de 94°C 30 s, hibridación durante 45 s min a 55°C y una elongación de 72°C durante 1 min y 30 s, y una extensión final de 72°C durante 10 min. La visualización de los productos de PCR se realizó tal y como se ha descrito anteriormente para la región ITS mediante electroforesis horizontal de gel de agarosa al 2% (p/v).

V.2.4 Cribado de la actividad antagonista de las levaduras aisladas mediante confrontación directa

V.2.4.1 Cultivo de los microorganismos y normalización del contenido de conidios y células de levaduras

Los mohos utilizados para el ensayo de confrontación directa se crecieron en agar PDA a 25°C hasta su esporulación. Para obtener los conidios, se añadieron sobre la colonia 10 mL de Tween al 0,05%, se raspó suavemente la superficie de la colonia con la ayuda de un asa de digralsky y se recogió la solución para filtrarlo a través de una gasa estéril para eliminar los fragmentos de micelio.

Las levaduras utilizadas en los ensayos se crecieron rutinariamente en agar de extracto de levadura peptona dextrosa (YPD, Condalab, Madrid, Madrid, España) durante 48 h a 25°C. Posteriormente, con la ayuda de un asa de siembra se recogió la levadura crecida y se suspendió en un tubo de 1,5 mL conteniendo 500 µL de agua estéril.

Para normalizar las concentraciones de conidios y células de levaduras se realizó un recuento directo con una cámara de Neubauer de MARIENFELD y un microscopio Leica mod. DM2000 LED. Para hacer el recuento se escogieron los cuadrados nº 3 que se muestran en la **Figura V.3**, los cuales presentan un área de 0,04 mm². Una vez

localizados los cuadrados se contaron en zigzag el número de conidios o células en cuatro cuadros diferentes. Se realizó la media aritmética de los cuatro cuadros y aplicando la fórmula que se puede observar en la **Ecuación IV.1**, con la cual se obtuvo la concentración de células de la solución inicial.

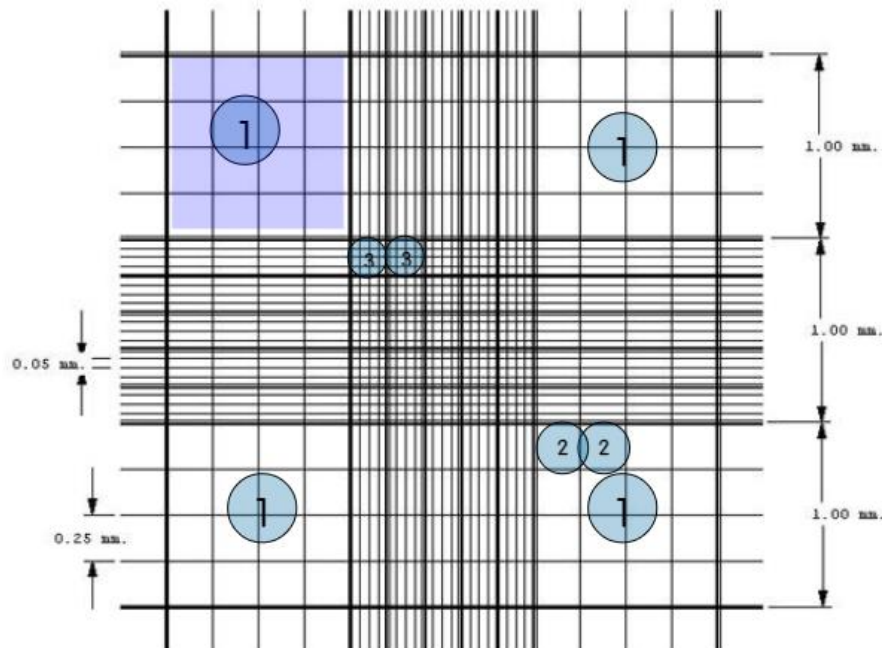


Figura V.3. Diagrama del área de recuento de la cámara de Neubauer, en el cuadro n°3 es donde se realizó el recuento (Vega y Voltolina, 2007).

$$N^{\circ} \text{ esporas/ml} = \frac{N^{\circ} \text{ celulas}}{0,04\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} \times 0,001\text{ml/mm}^3}$$

(Ec. V.1)

Cuando se obtuvo el número de conidios o células en cada solución inicial se procedió a hacer las diluciones necesarias con agua estéril para obtener la concentración deseada (especificada en cada prueba) en el inóculo de cada moho o levadura.

V.2.4.2 Confrontación directa de levadura y moho en agar PDA acidificado

La determinación de la capacidad antagonistas de los aislados de levadura contra los aislados de mohos alterantes (2 cepas de *Penicillium glabrum*: M1307 y M204) se realizó mediante enfrentamiento directo de las diferentes levaduras contra las dos cepas

Material biológico y diseño experimental

de moho alterantes en placas de agar de PDA acidificadas. Para ello, en la superficie de la placa de agar PDA se añadieron 200 μL de una solución de conidios a una concentración de 10^5 conidios/mL y se extendieron homogéneamente con un asa de digralsky por toda la superficie la placa de agar PDA. Tras su secado, se pipetearon 5 μL de una suspensión de cada levadura (2×10^7 células/ mL) en la superficie de la placa. En cada placa se enfrentaron 6 aislados de levadura frente al moho diana. Como controles de crecimiento de cada moho alterante, se realizó en mismo ensayo utilizando agua destilada estéril (5 μL) en lugar de la solución de levadura. Posteriormente, las placas se incubaron durante 5 días a 25 °C. Las modificaciones en el crecimiento del moho diana en presencia de las levaduras se compararon con las placas de control en ausencia de levadura. Las confrontaciones se realizaron por triplicado. Los aislados de levadura que indujeron las mayores modificaciones en el crecimiento del micelio de los mohos diana se seleccionaron para los ensayos posteriores de caracterización de la actividad antagonista. Además, también se seleccionaron como controles negativos los aislados de levadura que no mostraron interacciones notables contra los mohos diana.

V.2.5 Caracterización de la actividad antagonista

Con el objetivo de determinar el tipo de actividad antagonista de los aislados de levaduras que mostraron actividad frente a los mohos alterantes de la especie *P. glabrum* se realizaron diferentes pruebas para así poder definir el mecanismo de acción de estas.

V.2.5.1 Producción de compuestos volátiles orgánicos antifúngicos (VOCs)

La determinación de la capacidad de producción de VOCs se realizó mediante el sistema de doble placa (DDS) (**Figura IV.4**) tal y como describieron Ruiz-Moyano *et al.* (2020). Brevemente, en el centro de una placa de agar PDA acidificado se inocularon 5 μL de una suspensión de 10^6 conidios/mL en el punto central, Paralelamente en otra placa de agar PDA acidificado, se inocularon 100 μL de una suspensión de levaduras de 10^7 células/mL y se extendió homogéneamente por toda la placa con un asa de digralsky. Posteriormente, se descartaron las tapas de las placas de Petri de agar PDA, estas placas de agar fueron confrontadas y selladas con parafilm™. Posteriormente, se realizaron 4 perforaciones (3 mm \times 5 mm) en la unión de ambas placas para evitar la acumulación de CO₂ producido por los microorganismos en el interior del DDS. Como control se realizó el DDS, una de ellas inoculada con el moho diana (5 μL de una suspensión de 10^6

conidios/mL) y la otra placa de agar PDA sin inocular con levadura. Finalmente, las confrontaciones en el sistema de doble placa y los controles se incubaron a 25°C durante 10 días. Diariamente se midió el diámetro del crecimiento del moho en dos direcciones con una regla. Con los datos obtenidos se determinó en el moho diana la fase lag o fase latencia (expresada en días), la tasa de crecimiento (expresadas en mm/día) y la reducción del crecimiento del moho diana respecto al control mediante la representación del crecimiento a lo largo de los días y la obtención de la ecuación de la curva de crecimiento, esto se calculó mediante la **ecuación IV.2**. Las confrontaciones con todos los aislados de levadura se hicieron por triplicado por cada moho diana, y el ensayo se realizó dos veces.

$$\text{Inhibición (\%)} = (\text{DC} - \text{DT}) / (\text{DC}) \times 100$$

(Ec. V.2)

donde DC es el diámetro del micelio en control (mm), y DT es el diámetro del micelio del moho objetivo confrontado con levadura en DDS.

Por otro lado, en aquellas levaduras que mostraron una mayor inhibición de los mohos diana mediante VOCs se repitió el ensayo de confrontación en sistema de doble placa para analizar e identificar los compuestos volátiles responsables de la actividad de cada levadura. La extracción de los compuestos del DDS se realizó tal y como describieron Ruiz-Moyano *et al.* (2020) mediante microextracción en fase sólida (SPME) con una fibra de 10 mm de longitud y 75 µm de grosor recubierta de Carboxen/polidimetilsiloxano (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) (**Figura V.4**). El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890 GC acoplado a un detector masas modelo 5973 (Agilent Technologies, Little Falls, DE, EE. UU.) utilizando una columna de polidimetilsiloxano 5% fenil-95% (30 m × 0,32 mm de diámetro interior, 1,05 µm de espesor de película, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE. UU.).

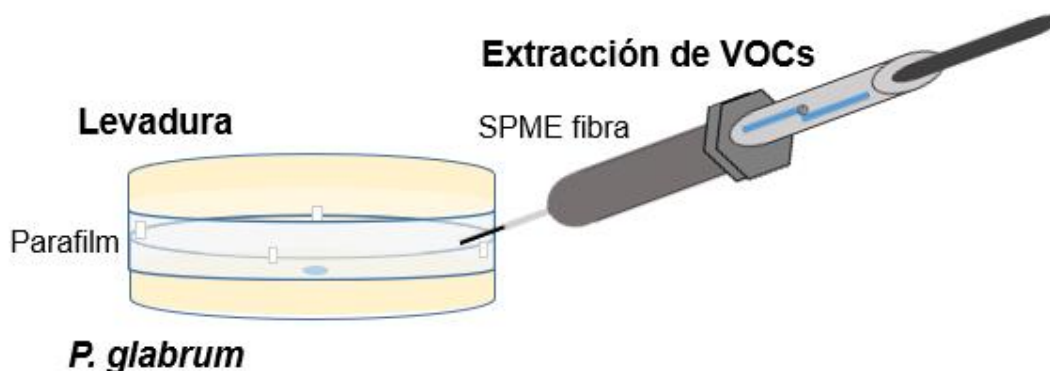


Figura V.4. Sistema de doble placa (DDS) utilizado para la determinación de la producción de compuestos volátiles antifúngicos. Detalle del proceso de extracción de los compuestos volátiles mediante microextracción en fase sólida (Modificado de Ruiz-Moyano *et al.*, 2020).

La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación con patrones, mediante la base de datos NIST y mediante los índices de Kovats.

V.2.5.2 Inhibición de la germinación de las esporas de los mohos alterantes

La evaluación de la capacidad de los asilados de levaduras de inhibir la germinación de los conidios se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Ruiz-Moyano *et al.* (2016). Primeramente, se sembró en superficie en agar PDA acidificado 100 μL de una suspensión de conidios (10^5 conidios/mL) del moho diana y se extendió homogéneamente por la placa con un asa de digralsky. Posteriormente, una vez la placa de agar PDA inoculada con el moho había secado, se inocularon 100 μL de una suspensión de la levadura antagonista a una concentración específica en superficie y se extendió homogéneamente con un asa de digralsky. La actividad de inhibición de las esporas se evaluó a tres concentraciones diferentes de levadura, 2×10^5 células/mL, 2×10^6 células/mL y 2×10^7 células/mL. Como control se realizó el mismo ensayo inoculando 100 μL de agua estéril en lugar de la suspensión de levaduras. Las placas fueron incubadas a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 h. Después de la incubación se evaluó en 100 conidios por muestra el tamaño del tubo germinativo mediante la observación con 20X aumentos en un microscopio LED Leica DM 2000 (DMLS, Leica, Buccinasco, MI, Italia). Una espora se consideró germinada cuando la longitud del tubo germinativo fue mayor que el diámetro de la espora. El porcentaje de reducción de la germinación de esporas se calculó

comparando el número de esporas germinadas en las placas confrontadas con levadura y mohos con respecto a la germinación en los controles. Además, también se midió el tamaño de los tubos germinativos en las confrontaciones y el control. El experimento se realizó en triplicado por cada aislado de levadura.

V.2.5.3 Parasitismo directo

La evaluación de la capacidad de los aislados de levadura de parasitar las hifas de los mohos diana se realizó siguiendo la metodología descrita por Ruiz-Moyano *et al.* (2016) con modificaciones. En concreto, primeramente, en placas de agar PDA acidificado (8 mL por placa) se inoculó el moho diana en tres puntos equidistantes de la placa con 5 μ L de una suspensión de conidios de 10^4 conidios/mL. A continuación, se inocularon 5 μ L en el borde de los inóculos de moho de una suspensión de células del aislado de levadura a 10^6 células/mL (**Figura V.5**). A las 12, 24 y 48 h de incubación a 25 °C los cultivos se lavaron con agua del grifo durante 60 s, con el objetivo de eliminar las levaduras no adheridas a las hifas, se añadió una gota de azul de lactofenol para teñir y seguidamente se observó la interacción con la utilización de un microscopio LED Leica DM 2000.

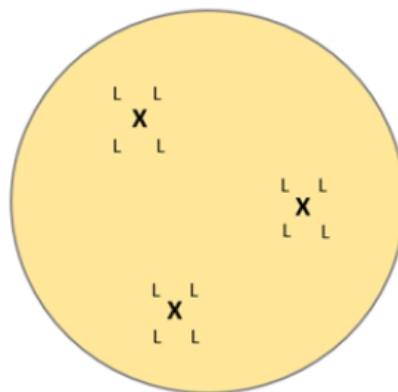


Figura V.5. Esquema de la ubicación de las inoculaciones del moho (X) y de las cepas de levaduras (L) (Capilla, 2017).

Las levaduras presentaron capacidad de parasitar a las hifas cuando mostraron adhesión a las mismas.

Material biológico y diseño experimental

V.2.5.4 Producción de sustancias extracelulares: antibiosis

La capacidad de secretar sustancias antifúngicas de los aislados de levaduras se determinó en diferentes medios de cultivo con el objetivo de verificar si la composición del medio influía en este mecanismo de acción en las levaduras que lo presentaban.

Para la determinación de la antibiosis se utilizaron tres medios de cultivo diferente, caldo YPD (Condalab), caldo dextrosa patata (PD, Condalab) y caldo extracto de malta (YM, 3 g/L de extracto de levadura (Pronadisa), 3g/L de extracto de malta (Condalab), 5g/L peptona, 10 g/L de glucosa). En cada medio de cultivo por cada asilado de levadura se realizaron los siguientes cultivos:

- Diez mL de caldo inoculado con 50 μ L de una suspensión de levaduras a 2×10^7 células/mL.
- Diez mL de caldo inoculado con 50 μ L de una suspensión de levaduras a 2×10^7 células/mL y 50 μ L de una suspensión de conidios del mohó diana a 10^5 conidios/mL.
- Diez mL de caldo inoculado con 50 μ L de una suspensión de levaduras a 2×10^7 células/mL e hifas inactivadas del mohó diana. La inactivación de las hifas consistió en el cultivo de 50 μ L de solución de conidios (10^5 conidios/mL) en 10 mL del respectivo caldo de cultivo. El cultivo se incubó a 25 °C durante 5 días a 100 rpm. Posteriormente, el cultivo se autoclavó a 121 °C durante 16 minutos y se centrifugó 1 mL del cultivo a $5000 \times g$ durante 5 min. El pellet obtenido (hifas inactivadas) se utilizó para inocular los 10 mL de caldo de cultivo junto con la levadura.

Las diferentes opciones de los cultivos se incubaron a 25 °C durante 48 h. Tras la incubación, se centrifugaron 5 mL a $10.621 \times g$ durante 5 min, y el sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 μ M de tamaño de poro. Para la determinación de la actividad del sobrenadante, previamente se sumergió un disco de papel estéril en el extracto extracelular obtenido durante 5 s. Después, el disco se colocó en placas de PDA previamente sembradas en superficie con 100 μ L de una solución de 10^5 conidios/mL del mohó diana. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48 h y se registraron las alteraciones en el crecimiento de los micelios y los halos de inhibición. La

determinación se realizó por duplicado en tres extractos diferentes por cada una de las tres opciones de cultivo realizadas.

V.2.5.5 Producción de enzimas líticas

En la caracterización de la presencia de enzimas líticas se evaluaron 4 tipos diferentes de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular. Para ello, en los diferentes medios de cultivo se inocularon 5 μ L de la solución del aislado de levadura (10^7 células/mL). La determinación fue realizada en triplicado para cada aislado de levadura.

La actividad enzimática quitinasa y β -glucanasa fue evaluada tal y como describe Cordero-Bueso *et al.* (2017) utilizando YPD agar suplementado con 0,2% de quitina (Sigma St. Louis, MO, EUA) y 0,2 % β -glucano (Sigma St. Louis, MO, EUA). Después de 5 días de incubación a 25 °C, las placas fueron reveladas con rojo congo. La presencia de halos rojos significó la presencia de estas enzimas.

La actividad pectinasa se analizó en placas de agar YPD suplementadas con un 10% de pectina de manzana (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Tras 5 días de incubación a 25 °C, las placas se inundaron con bromuro de hexadeciltrimetilamonioal 10% (CTAB). La actividad fue positiva cuando se observó la presencia de halos claros.

Por último, la actividad proteasa fue evaluada en medio de agar leche desnatada al 10% (AppliChem, Alemania) y 1,5% de agar bacteriológico (Pronadisa, Barcelona, España) (Parafati *et al.*, 2015). La actividad fue positiva cuando tras 5 días de incubación a 25°C se observaron halos claros alrededor de las colonias de levaduras.

V.2.5.6 Producción de biofilm

La determinación de la formación de biofilm *in vitro* se llevó a cabo tal y como describe Cordero-Bueso *et al.* (2017). Concretamente, se inocularon 10 μ L de suspensión de levadura (10^7 células/mL) en 1 mL de caldo base de nitrógeno de levadura (YNB, Condalab) suplementado con 100 mM de glucosa. El cultivo se incubó durante la noche a 28 °C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2935 \times g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y los pellets se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS, Thermo Fisher Scientific, España) y se resuspendieron en medio YNB + glucosa (100 mM) para obtener 10^7 células/mL.

Material biológico y diseño experimental

La fase de adhesión se consiguió con la inoculación de 100 μL de la suspensión de células en los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Thermo Fisher Scientific). La placa se incubó a 28 °C en agitación (90 rpm) durante 3 horas. Posteriormente, los pocillos fueron lavados 2 veces con 150 μL de PBS y seguidamente se añadieron 100 μL del YNB + glucosa (100 mM). La placa se volvió a incubar a 28°C en agitación (90 rpm) durante 72 horas. El medio fue reemplazado diariamente con 100 μL de medio fresco. Después de la incubación, los pocillos fueron lavados 2 veces con 150 μL de PBS, se añadieron 100 μL de cristal violeta al 0,4% (p/v) en cada pocillo y se incubó durante 45 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiró el colorante no fijado mediante 4 lavados con 150 μL de agua destilada estéril, y finalmente se añadieron 200 μL de etanol al 95% (v/v). Después de 45 minutos, 100 μL de la solución de cada pocillo fue transferida a una nueva placa de 96 pocillos y fue medida a 590 nm en un lector multiplacas FLUOstar Óptima (BMG LABTECH, Alemania). A los valores de absorbancia se le restaron los valores del control negativo, pocillo sin inoculación de levadura. El ensayo fue realizado por triplicado.

V.2.5.7 Competición por nutrientes

El mecanismo de competición por nutrientes fue evaluado por metodologías diferentes.

En primer lugar, se evaluó el consumo de hierro siguiendo la metodología descrita por Cordero-Bueso *et al.* (2017). Brevemente, se prepararon placas de agar PDA suplementado con 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de FeCl_3 . Una vez solidificadas, se sembraron en superficie 100 μL de una solución de conidios 10^5 conidios/mL. Posteriormente, se sembraron 5 μL de la solución del aislado de levadura a 10^7 células/mL. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se registró la presencia de halos de inhibición.

El segundo lugar, se evaluó la competición por nutrientes mediante inoculación en uvas siguiendo la metodología descrita por Ruiz-Moyano *et al.* (2016). Para ello, uvas sanas fueron esterilizadas mediante inmersión durante 3 minutos en una solución de hipoclorito sódico con una concentración de 100 ppm. Seguidamente se hizo un aclarado de las uvas con agua estéril y se dejaron secar al aire. Una vez preparadas las uvas, en cada una se realizó una lesión con una punta esterilizada (3 mm de ancho \times 3 mm de

profundidad) para ser posteriormente inoculadas. Los tratamientos consistieron en la inoculación de 10 μL de 2×10^7 células/mL del aislado de levadura, seguida de la adición de 3 μL de la solución de conidios del moho diana a 10^5 conidios/mL. El ensayo se repitió realizando la misma confrontación, pero añadiendo además 10 μL de caldo YNB. Como controles, se inocularon uvas con el moho diana y la levadura de forma independiente.

Cada uva inoculada se colocó en un bote de plástico estéril a 25 °C durante 5 días. Periódicamente, se registró el porcentaje de uvas con lesiones por moho en la herida. Un aumento significativo de la incidencia del moho diana por la adición de YNB fue considerado un resultado positivo de competencia positiva por nutrientes. Se utilizaron diez uvas por tratamiento y el ensayo se repitió tres veces.

V.2.6 Evaluación de la actividad antagonista *in vivo*

Para este ensayo se siguió la metodología de la inoculación en uva descrita en el apartado anterior sin la utilización de YNB. El ensayo se realizó por cada levadura en 30 uvas diferentes y se repitió tres veces. La obtención de resultados consistió en anotar la incidencia (uvas con alteración por moho en la lesión inoculada) del moho diana en presencia y ausencia de la levadura antagonista y con estos datos establecer el porcentaje de incidencia del moho diana en presencia y ausencia de la levadura antagonista.

V.2.7 Tratamiento de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete de software SPSS para Windows versión 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los porcentajes se convirtieron en valores angulares de Bliss antes del análisis. Las diferencias significativas y los grupos homogéneos de medias del porcentaje de germinación, el tamaño del tubo germinativo, la fase lag de crecimiento, la tasa de crecimiento, la inhibición del crecimiento y la incidencia del moho se establecieron mediante un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo los procedimientos de una vía. Cuando el efecto de la interacción es significativo ($p \leq 0,050$) se procedió a la realización de un análisis de comparación de medias por el método TUKEY que determina la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta sea estadísticamente significativa.

V.3 Resultados

V.3.1 Recuentos

V.3.1.1 Recuentos microbianos e identificación de especies de levaduras y mohos

Los recuentos medios de levaduras y mohos en racimos sanos y dañados fueron de $6,66 \pm 1,08$ y $3,91 \pm 2,73 \log_{10}$ UFC/g ($p = 0,021$) respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas en la población de mohos entre racimos sanos y racimos dañados, con valores de $3,74 \pm 2,57$ y $4,39 \pm 1,84 \log_{10}$ UFC/g ($p = 0,516$), respectivamente.

Se aislaron un total de 54 levaduras de muestras de uva sana. La identificación molecular se realizó mediante ITS1-5,8S rDNA-ITS4, que dio como resultado seis especies diferentes (**Tabla V.2**). *Aureobasidium pullulans* y *P. terricola* (antes *Issatchenkia terricola*) se aislaron de todas las muestras analizadas. Le siguieron *Pichia kudriavzevii* (antes *Issatchenkia orientalis*) aislada en 8 muestras, *H. uvarum* (4 muestras), *Hormonema viticola* (2 muestras) y *Zygoascus meyeriae* (1 muestra). Todas las secuencias presentaban identidades superiores al 99% con los números de acceso depositados previamente en la base de datos GenBank.

Tabla V.2. Identificación de las especies de levaduras (especie, porcentaje de identificación y número de acceso de referencia), número de aislados y presencia de la especie por 10 racimos.

Aislados	Presencia por diez racimos	Especie de identificación	Porcentaje de identidad	Numero de acceso
Levaduras				
13	10	<i>Pichia terricola</i>	100	NR153994
8	6	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100	KY104583
17	10	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	KX869960
8	4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.86	KY103573
6	2	<i>Hormonema viticola</i>	99.82	NR137620
2	1	<i>Zygoascus meyeriae</i>	10	KY106012
Hongos filamentosos				
18	10	<i>Penicillium glabrum</i>	100	AY373915
1	1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	HQ832794
11	4	<i>Alternaria alternata</i>	100	MG733652
3	2	<i>Aspergillus nigricans</i>	100	KP124341

En cuanto a la disposición de mohos, se obtuvieron un total de 33 aislados de mohos de racimos de uva con síntomas. Estos se agruparon en cuatro especies (**Tabla V.2**). *Penicillium glabrum* fue la especie que más número de veces se aisló; estando presente en todos los racimos con daños. Además, en cuatro muestras se observaron únicamente morfologías compatibles con *P. glabrum*. En segundo orden de importancia, *Alternaria alternata* se detectó en cuatro de las 10 muestras de racimos con daños; *Aspergillus nigricans* en dos, y *Cladosporium cladosporioides* sólo en un racimo con daño.

De acuerdo con la incidencia de *P. glabrum* en las muestras dañadas, esta especie fue el objetivo del cribado de biocontrol con las levaduras aisladas. Se realizó una identificación genética precisa de *P. glabrum* en los 18 aislados secuenciando también los genes de la subunidad grande (LSU) 26S rDNA, β -tubulina y calmodulina. Se encontraron secuencias idénticas en ITS1-5,8S rDNA-ITS4 y LSU 26S rDNA en *P. glabrum*. Sin embargo, se encontraron dos grupos de secuencias diferentes en β -tubulina (5 sustituciones y una indel) y calmodulina (3 sustituciones). Las diferencias intraespecíficas se confirmaron mediante la comparación de los perfiles de cuatro marcadores ISSR-PCR. Los 18 aislados se agruparon en los dos grupos intraespecíficos antes citados basándose en las diferencias de una banda con (CAG)₄, dos bandas con (GTG)₅, tres bandas con UBC809 y una banda con UBC817 (**Figura V.6**). Se seleccionó un miembro de cada subgrupo genético para el cribado de la actividad antagonista con las levaduras seleccionadas.

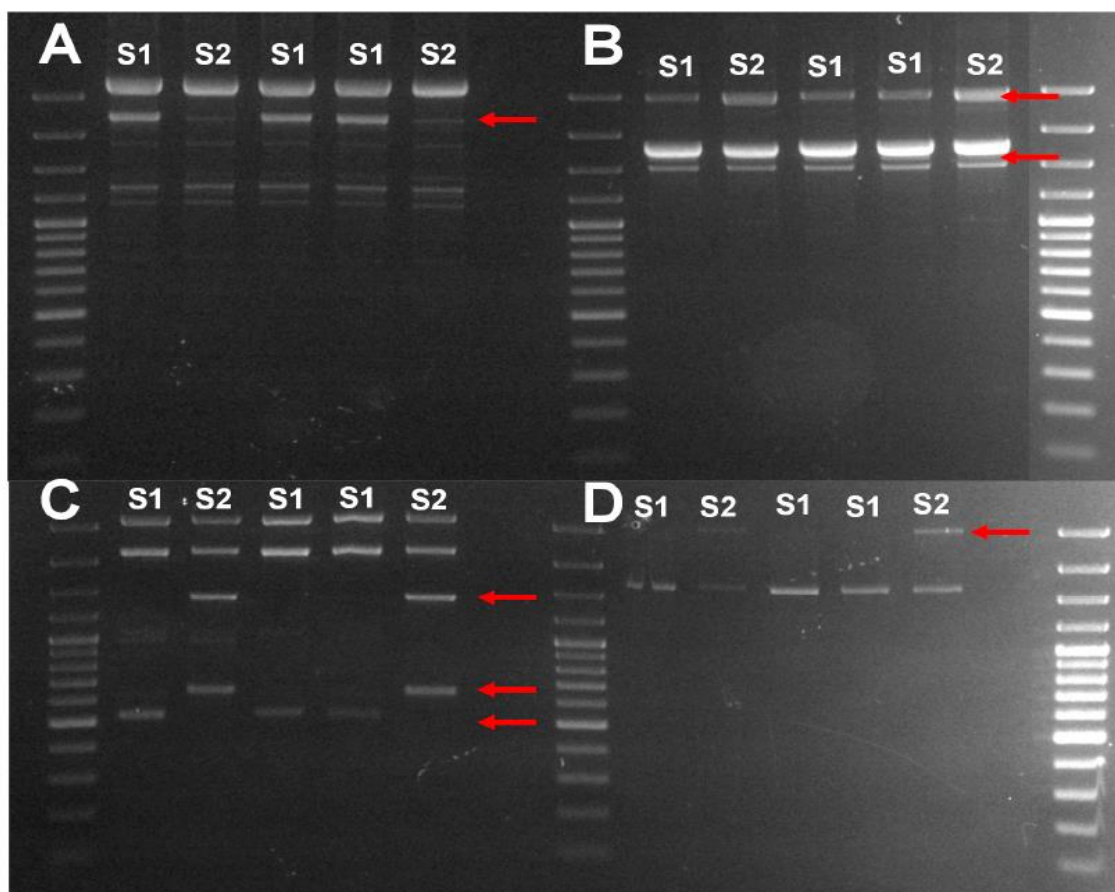


Figura V.6. Gel de agarosa de los perfiles ISSR-PCR de 5 aislados de *P. glabrum* con los cebadores (A) (CAG)₄; (B) (GTG)₅; (C) UBC809 y (D) UBC817. Los perfiles de banda S1 y S2 muestran los perfiles de los dos subgrupos genéticos de *P. glabrum*.

V.3.2 Detección de la actividad antagonista por confrontación directa

Los 54 aislados de levadura (**Tabla V.2**) se confrontaron con las dos cepas de *P. glabrum* seleccionadas. El análisis de los resultados mostró que las levaduras provocaron diferentes tipos de alteraciones en el desarrollo de los mohos. Los aislados pertenecientes a las especies *P. kudriavzevii* y *H. uvarum* fueron cubiertos por las hifas de *P. glabrum* como se muestra en la **Figura V.7A**. Otras levaduras, como los aislados de *Z. meyeriae*, mostraron un comportamiento neutro en el que no se observó modificación del micelio ni del desarrollo de la levadura (**Figura V.7B**). La mayoría de los aislados de *A. pullulans* mostraron una capacidad nula de competencia contra *P. glabrum*, que cubrían completamente las zonas de inoculación. Sin embargo, dos aislados mostraron una interacción contra *P. glabrum* en la que se puede apreciar una esporulación más intensa alrededor de la colonia (**Figura V.7C**) y halo de inhibición (**Figura V.7F**). Los aislados

de *Hormonema viticola* estaban cubiertos de moho, aunque las hifas estaban visualmente modificadas (**Figura V.7D**). Por ultima, 7 de 18 aislados de *P. terricola* presentaba un halo claro sin hifas rodeando la zona de inoculación. El aspecto visual indicaba que una zona clara podía estar asociada a la colonización del espacio más que la secreción de sustancias inhibitoras. Los aislados produjeron halos de tamaños comprendidos entre 2 y 8 mm.

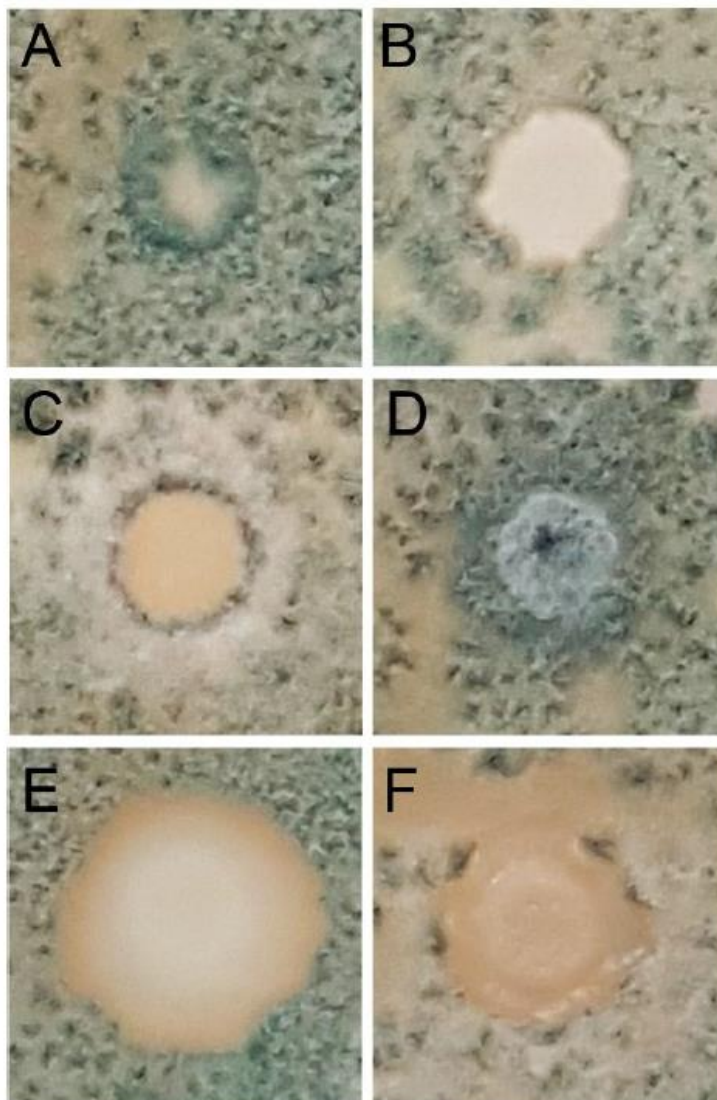


Figura V.7. Imágenes del enfrentamiento directo entre *Penicillium glabrum* y *Hanseniaspora uvarum* (A), *Hormonema viticola* (B), *Aureobasidium pullulans* (C, F); *Zygoascus meyeri* (D) y *Pichia terricola* (E).

Basándonos en los resultados de la confrontación directa con las dos cepas de *P. glabrum* que dieron lugar a la inhibición o modificación de su crecimiento, se

Resultados

seleccionaron los aislados *P. terricola* L14, *A. pullulans* L30 y L31, y *H. viticola* L21 para la posterior caracterización de sus mecanismos de actividad antagonista, *P. kudriavzevii* L18, *Z. meyeræ* L29 y *H. uvarum* L35 se utilizaron como controles negativos de la actividad.

V.3.3 Caracterización del mecanismo de la actividad antagonista contra *Penicillium glabrum*

En primer lugar, en relación con la producción de VOC antifúngicos por las levaduras seleccionadas en los sistemas de doble placa de los controles sin levadura de *P. glabrum* crecieron a una velocidad de $5,45 \pm 0,07$ (cepa PG1307) y $5,51 \pm 0,16$ (cepa PG204) mm día⁻¹ a 25°C. En las confrontaciones, la tasa de crecimiento de *P. glabrum* 1307 disminuyó significativamente con los compuestos volátiles producidos por *P. kudriavzevii* L18 ($p \leq 0,001$) (**Tabla V.3**). El resto de las confrontaciones no inhibieron el crecimiento del moho; incluso se detectó un aumento de la tasa de crecimiento para PG204. Las fases de latencia de *P. glabrum* fueron $0,86 \pm 0,01$ día⁻¹ para PG 1307 y $0,61 \pm 0,09$ día⁻¹ para PG204. Estos periodos de adaptación se incrementaron en presencia de volátiles de levaduras de *P. terricola* L14 y *P. kudriavzevii* L18. Los valores de la fase de latencia aumentaron a 1,52 y 1,65 día⁻¹ para PG1307 y a 1,02 y 1,35 día⁻¹ para PG204, respectivamente. Del mismo modo, la fase de latencia de PG204 aumentó significativamente ($p \leq 0,050$) en el resto de las confrontaciones, excepto en presencia de *Z. meyeræ* L29.

Tabla V.3. Parámetros de crecimiento (μ y fase de latencia) y porcentaje de reducción de micelios de *Penicillium glabrum* expuestos a compuestos orgánicos volátiles (VOC) producidos por las levaduras seleccionadas.

Confrontación	μ (mm día ⁻¹)		Fase de latencia (día-1)		Reducción porcentual del tamaño de los micelios (día 4)	
	Media	DS ¹	Media	DS	Media	DS
<i>Penicillium glabrum</i> 1307						
Control	5,45 ^{d, e, f, l}	0,07	0,86 ^{e, f}	0,01	-	-
<i>Pichia terricola</i> L14	5,77 ^{a, b, c, d}	0,29	1,52 ^{a, b}	0,19	9,17 ^b	4,00
<i>Pichia kudriavzevii</i> L18	4,73 ^g	0,25	1,65 ^a	0,12	31,48 ^a	2,50
<i>Hormonema vitícola</i> L21	4,93 ^{f, g}	0,07	0,87 ^{e, f}	0,03	6,06 ^{b, c, d}	3,61
<i>Zygoascus meyeræ</i> L29	5,77 ^{a, b, c, d}	0,14	1,11 ^{c, d, e}	0,09	-0,10 ^{d, e}	5,73
<i>Aureobasidium pullulans</i> L30	5,72 ^{b, c, d}	0,16	1,03 ^{d, e}	0,04	-1,65 ^e	3,75
<i>Aureobasidium pullulans</i> L31	5,59 ^{c, d, e}	0,09	1,00 ^{d, e}	0,08	-2,38 ^e	2,60
<i>Hanseniaspora uvarum</i> L35	5,51 ^{d, e}	0,08	1,02 ^{d, e}	0,09	1,38 ^{c, d, e}	6,02
<i>Penicillium glabrum</i> 204						
Control	5,51 ^{e, f}	0,16	0,61 ^e	0,09	-	-
<i>Pichia terricola</i> L14	5,30 ^{e, f, g}	0,04	1,02 ^{d, e}	0,03	9,84 ^b	3,34
<i>Pichia kudriavzevii</i> L18	5,10 ^{f, g, h}	0,24	1,35 ^{a, b}	0,11	23,91 ^a	1,68
<i>Hormonema vitícola</i> L21	6,18 ^{a, b, c}	0,05	1,22 ^{b, c}	0,04	11,23 ^b	1,96
<i>Zygoascus meyeræ</i> L29	5,85 ^{d, e}	0,14	0,77 ^e	0,08	2,69 ^{c, d, e}	3,05
<i>Aureobasidium pullulans</i> L30	6,27 ^{a, b}	0,26	1,24 ^{a, b, c}	0,11	2,08 ^{c, d, e}	4,44
<i>Aureobasidium pullulans</i> L31	6,08 ^{a, b, c, d}	0,31	1,08 ^{b, c, d, e}	0,21	7,00 ^{b, c}	2,05
<i>Hanseniaspora uvarum</i> L35	6,41 ^a	0,04	1,33 ^{a, b}	0,02	7,37 ^{b, c}	1,95
p	< 0,001		< 0,001		< 0,001	

¹ DS: desviación estándar.

^{a-h} por columnas, valores medios con diferentes letras indica diferencias estadísticamente significativas.

Otro parámetro estudiado fue la reducción del diámetro del micelio (**Tabla V.3**). A los 4 días de confrontación, *P. kudriavzevii* L18, a través de la producción de VOCs, causó la mayor inhibición de *P. glabrum* (31,48 \pm 2,50% y 23,91 \pm 1,68% para PG1307 y PG204, respectivamente). *Pichia terricola* L14 y *Z. meyeræ* L29 inhibieron de manera significativa el crecimiento de ambos mohos. *Penicillium glabrum* 204 redujo su crecimiento también al ser expuesto a los volátiles de *A. pullulans* L31 y *H. uvarum* L35.

Resultados

En la **Tabla V.4** se muestra la inhibición de la germinación de las esporas y la reducción del tamaño del tubo germinativo por las levaduras seleccionadas. No se encontraron diferencias en el porcentaje de esporas germinadas entre ambas cepas de *P. glabrum*, con $88,78 \pm 4,03\%$ para PG1307 y un $94,74 \pm 3,93\%$ para PG204 tras 10 h de incubación. El tamaño del tubo germinativo fue de $71,61 \pm 30,50 \mu\text{M}$ para PG1307 y $87,02 \pm 42,20 \mu\text{M}$ para PG204. *Pichia terricola* L14 fue la única levadura seleccionada que redujo la germinación de conidios. Hubo una reducción significativa para las tres concentraciones de células de *P. terricola* L14 ensayadas, y fue dependiente de la concentración de levadura ($p \leq 0,050$). Además, se observó una reducción del tamaño del tubo germinal por confrontación con *P. terricola* L14 y *P. kudriavzevii* L18. Los tubos germinales en estas confrontaciones tenían alrededor de la mitad del tamaño de los controles. Sin embargo, no se observó ninguna influencia significativa de la concentración de células de levadura sobre el tamaño del tubo germinativo.

Los resultados para los demás mecanismos de antagonismo estudiados (parasitismo, antibiosis, producción de enzimas líticas, formación de biopelículas y competencia por nutrientes) se muestran en la **Tabla V.4**. En el caso de *Z. meyeræ* L29 se observó una débil adhesión celular a las hifas de *P. glabrum*. El resto de las levaduras no mostraron capacidad de adhesión a las paredes celulares del moho.

Se observaron diferentes actividades enzimáticas. *Pichia terricola* L14 presentó actividad β -glucanasa. *Hormonema viticola* L21, *Z. meyeræ* L29 y *A. pullulans* L30 y L31 presentaron actividad quitinasa, β -glucanasa y pectinasa. Además, las dos cepas de *A. pullulans* analizadas mostraron actividad proteolítica. El ensayo de formación de biopelículas *in vitro* demostró que las cepas *P. terricola* L14, *Z. meyeræ* L29 y *H. uvarum* L35 fueron capaces de adherirse al fondo de los pocillos de poliestireno y retener el colorante cristal violeta.

Tabla V.4. Porcentaje de esporas germinadas y tamaño del tubo germinativo (μM) en contacto directo con las levaduras seleccionadas.

Confrontación	% esporas germinadas								Tamaño del tubo germinativo (μM)			
	10^5 células mL^{-1}		10^6 células mL^{-1}		10^7 células mL^{-1}		10^5 células mL^{-1}		10^6 células mL^{-1}		10^7 células mL^{-1}	
	Media	DS ¹	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	SD
<i>Penicillium glabrum</i> 1307												
Control			88,78	4,03					71,61	30,50		
<i>Pichia terrícola</i> L14	77,45*	5,32	65,97*	8,68	64,88*	5,25	35,13*	12,42	26,06*	9,088	27,93*	7,16
<i>Pichia kudriavzevii</i> L18	77,31	10,60	81,72	3,91	81,04	6,46	38,26	11,31	34,20*	17,61	35,13*	14,70
<i>Hormonema vitícola</i> L21	91,28	6,58	93,44	5,10	92,52	5,01	74,23	32,42	85,73	37,72	68,46	37,55
<i>Zygoascus meyeræ</i> L29	93,28	4,36	93,87	4,10	94,36	3,75	77,13	28,73	73,53	36,32	73,82	36,33
<i>Aureobasidium pullulans</i> L30	90,93	3,89	92,49	4,90	91,56	5,78	84,20	38,48	73,46	33,67	80,27	37,05
<i>Aureobasidium pullulans</i> L31	93,61	1,83	93,59	4,23	87,53	3,92	67,60	24,58	66,26	15,10	61,66	22,46
<i>Hanseniaspora uvarum</i> L35	94,13	0,61	91,48	4,88	92,18	5,53	72,40	28,96	77,49	27,99	76,46	18,67
<i>Penicillium glabrum</i> 204												
Control			93,74	3,93					87,02	42,20		
<i>Pichia terrícola</i> L14	75,50*	3,42	70,84*	2,82	63,61*	7,28	36,46	12,40	29,46*	17,53	29,13*	15,45
<i>Pichia kudriavzevii</i> L18	87,02	2,68	88,25	3,16	90,54	6,12	48,40	20,20	42,40*	24,23	37,33*	18,18
<i>Hormonema vitícola</i> L21	93,44	4,36	90,68	3,24	89,65	3,84	76,46	24,73	84,02	30,53	62,93	29,32
<i>Zygoascus meyeræ</i> L29	90,84	4,46	89,56	5,91	89,69	3,84	63,66	27,15	66,06	22,90	66,61	17,12
<i>Aureobasidium pullulans</i> L30	68,71	5,87	91,67	4,70	88,58	4,75	101,2	15,86	72,26	26,35	64,13	20,53
<i>Aureobasidium pullulans</i> L31	92,74	7,21	88,28	4,58	84,35	10,50	65,66	25,76	69,01	28,62	80,66	24,07
<i>Hanseniaspora uvarum</i> L35	97,89	2,88	95,69	4,23	92,08	5,96	71,13	29,59	62,42	22,52	64,06	15,91
p	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	

¹ DS: desviación estadística. *Diferencias estadísticas con el control ($p \leq 0,050$)

Resultados

Tabla V.5. Ensayos de la caracterización de los mecanismos de biocontrol.

Cepa	Parasitismo	Antibiosis	Actividades enzimáticas				Formación de biofilm	Competición por nutrientes	
			Quitinasa	β -glucanasa	Pectinasa	Proteasa		Agotamiento del hierro	Competición <i>in vitro</i>
<i>Pichia terricola</i> L14	- ¹	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Pichia kudriavzevii</i> L18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hormonema viticola</i> L21	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Zygoascus meyeræ</i> L29	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> L30	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> L31	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i> L35	-	-	-	-	-	-	+	-	-

¹: - significa que no hubo actividad; + que si hubo actividad.

La competencia por el hierro no fue el mecanismo de ninguna levadura seleccionada en este estudio (**Tabla V.5**). En las uvas, la capacidad de control de *P. terricola* L14 se redujo cuando se añadió caldo YNB a la herida. Todas las uvas presentaron desarrollo de micelio de *P. glabrum* después de 3 días de almacenamiento cuando se añadieron artificialmente nutrientes, mientras que alrededor del 10% de las uvas presentaron síntomas de desarrollo de *P. glabrum* sin adición de nutrientes. Por lo tanto, la competencia por los nutrientes puede estar asociada al antagonismo de esta cepa de levadura. Sin embargo, el resto de las levaduras enfrentadas a *P. glabrum* en uvas heridas no redujeron ($p \leq 0,050$) su capacidad de control cuando había nutrientes adicionales en las uvas.

V.3.4 Ensayo *in vivo* en uvas dañadas

Las uvas control que fueron infectadas con las cepas PG1307 y PG204 de *P. glabrum* mostraron que la incidencia de ambas cepas era similar (PG1307 **Figura V.8A**; PG204, **Figura V.8B**). Sin embargo, PG1307 fue más infectiva ($p \leq 0,050$), alcanzando el 100% de incidencia a los 6 días de inoculación, mientras que esto ocurrió a los 9 días con PG204. La confrontación de los mohos con las levaduras seleccionadas arrojó algunos resultados inesperados. Las levaduras sin propiedades antagónicas a priori, en el ensayo de confrontación directa redujeron significativamente la incidencia de *P. glabrum* en las uvas mientras que algunas cepas con antagonismo *in vitro* no fueron efectivas en las uvas. Las levaduras seleccionadas como neutras o “controles negativos”, como *P. kudriavzevii* L18, *H. viticola* L21 y *H. uvarum* L35, redujeron ($p \leq 0,050$) la incidencia de *P. glabrum* al 0%, 50% y 33%, respectivamente, a los 9 días de confrontación. Por el contrario, los aislados de *A. pullulans* no redujeron la incidencia de mohos, a pesar de que fueron seleccionados por su control del crecimiento de mohos en placas de PDA. Las otras levaduras antagonistas preseleccionadas, *P. terricola* L14 y *Z. meyeriae* L29 redujeron la incidencia de *P. glabrum* a 13 y 25%, respectivamente. Las **Figura V.8A** y **Figura V.8B** reflejan el desarrollo de los micelios en las uvas heridas. Sin embargo, el aspecto visual de las uvas inoculadas con las levaduras seleccionadas excluyó a varias de ellas como potenciales agentes de biocontrol. *P. terricola* L14 cambió las uvas a un color marrón como muestran las imágenes de la **Figura V.8**. *Hormonema viticola*, una “levadura negra” (Crous *et al.*, 2015), produjo ennegrecimiento de las heridas. Además, *H. uvarum* L35 produjo pardeamiento y depresión de las heridas. Esto se vio reflejado,

Resultados

en los controles El control sin inoculación de los mohos confirmó la capacidad de descomposición de estos tres aislados de levadura.

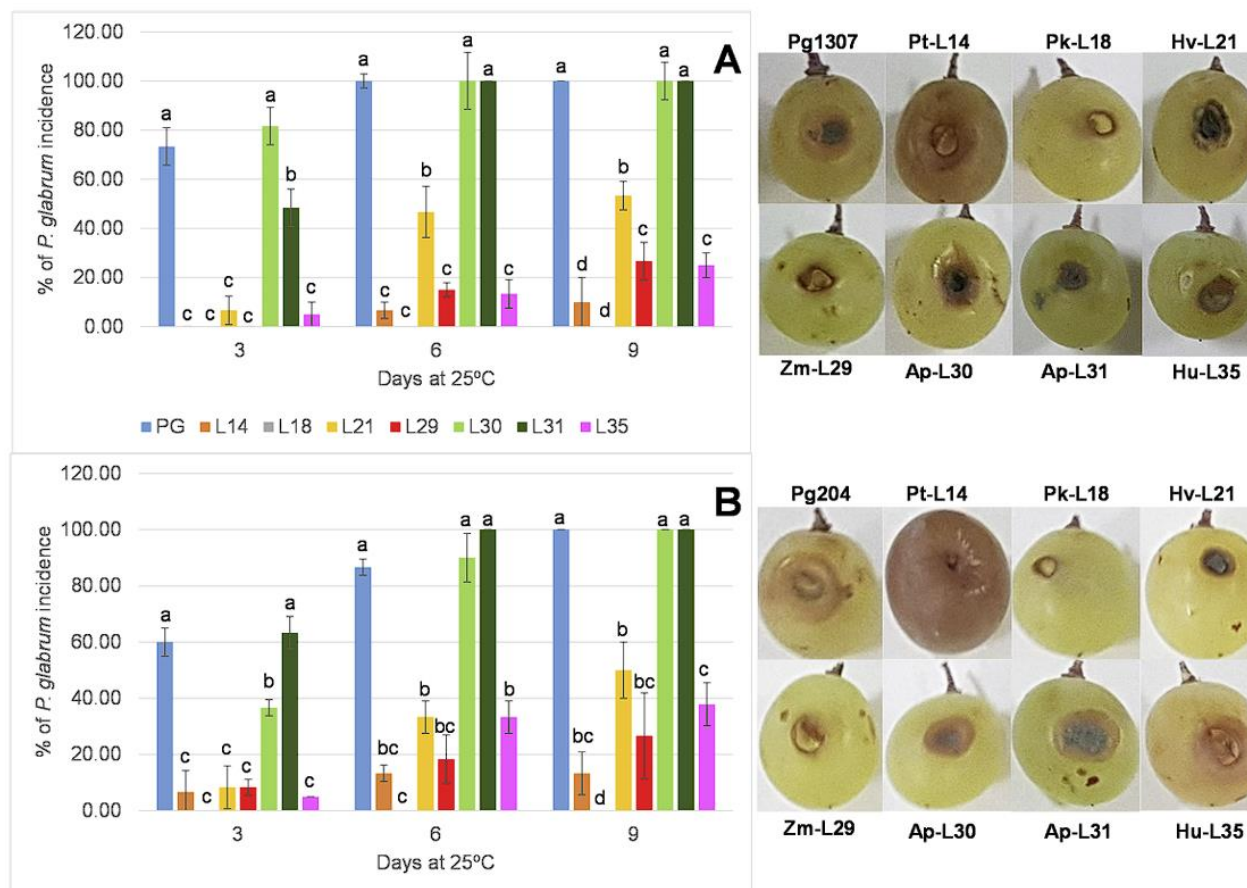


Figura V.8. Porcentaje de incidencia de la enfermedad y síntomas de enfrentamiento en uvas heridas a 25°C entre *Penicillium glabrum* 1307 (A), 204 (B) y los aislados de levadura *Pichia terricola* L14, *Pichia kudriavzevii* L18, *Hormonema viticola* L21, *Zygoascus meyeriae* L29, *Aureobasidium pullulans* L30 y L31 y *Hanseniopsis uvarum* L35. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,050$) en cada día de muestreo.

V.4 Discusión

Las poblaciones de levaduras de la uva varían en función de las prácticas, los vectores, el clima la zona geográfica, el estado de madurez, etc. (Setati *et al.*, 2012). Aunque controvertidos, en la literatura se muestran resultados e hipótesis sobre la influencia de estos factores en las poblaciones microbianas. Así, en trabajos anteriores se han registrado grandes diferencias en las poblaciones de levaduras. Settanni *et al.* (2012) informaron de recuentos elevados de levaduras en uvas procedentes de la zona vinícola de Marsala (Italia) con valores que oscilaban entre 3,54 y 6,92 log₁₀ UFC/g, valores coincidentes con la población de levaduras encontrada en el presente trabajo. Por el contrario, Bougreau *et al.* (2019), informaron de recuentos más bajos (10² a 10⁴ log₁₀ UFC/g) de levaduras en uvas sanas procedentes de Texas (EE. UU.). En general, los trabajos previos muestran un incremento de los recuentos de levaduras en uvas con síntomas de enfermedad respecto a las uvas sanas como se recogió en los trabajos de Nisiotou y Nychas (2007) y Guzzon *et al.* (2014).

En este trabajo se identificaron seis especies diferentes de levaduras. *Aureobasidium pullulans* y *Pichia* spp. que fueron las especies y géneros predominantes. Esta biodiversidad de especies fue similar a la detectada por Cordero-Bueso *et al.* (2017), que encontraron siete, seis y cinco especies diferentes en viñedos convencionales, ecológicos y biodinámicos, respectivamente. En este caso, *A. pullulans* y *H. uvarum* fueron las especies dominantes. En el mismo sentido, Drumonde-Neves *et al.* (2016) descubrieron que las actividades humanas aumentaban la biodiversidad de levaduras. Describieron un total de 23 especies diferentes dominadas por *H. uvarum* (66% de los aislados) y *P. terricola* (11%) en diferentes viñedos del Archipiélago de las Azores siendo la máxima diversidad por viñedo de 11 especies de levaduras. Otros trabajos han encontrado una mayor riqueza de especies en viñedos con diferentes sistemas de cultivo (Setati *et al.*, 2012), con entre 9 y 17 especies diferentes de levaduras. Sin embargo, ese análisis incluyó muestras de diferentes partes de la planta. El clima es otro factor que define la biodiversidad de levaduras. Lobón (Badajoz, España) pertenece a una zona climática con temperaturas medias en verano en torno a los 30°C y precipitaciones muy escasas (471 mm). Los niveles de precipitación podrían estar asociados con la biodiversidad y los patrones de las especies de levaduras, tal y como informan Castrillo *et al.* (2019) sobre uvas procedentes de cuatro zonas productoras diferentes de Galicia

(España) acogidas a denominaciones de origen protegidas (DOP). La zona más seca, DOP Monterrey (595 mm), presentó una menor riqueza de especies dominada por *A. pullulans* que la DOP Rías Baixas (1071 mm), dominada por *H. uvarum*. Asimismo, el número de especies de levaduras aumentó en dos zonas vinícolas españolas de clima Atlántico e interior en un año lluvioso (Longo *et al.*, 1991). Las malas condiciones sanitarias y el aumento de uvas dañadas por el cracking podrían favorecer la biodiversidad de levaduras, especialmente de especie oxidativas. En cualquier caso, año lluvioso o seco, la biodiversidad de levaduras fue mayor que nuestro número de especies de levaduras, con 21 y 28 especies. Por el contrario, una reducción de la biodiversidad de levaduras se observó tras un aumento de las precipitaciones (Drumonde-Neves *et al.*, 2016), lo que podría tener un efecto de lavado de las levaduras de la piel de la uva.

Las poblaciones de mohos suelen estar dominadas por *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Botrytis* y miembros de *Penicillium*, aunque esto también es variable según los estudios. Factores como las variedades, el clima o las prácticas culturales influyen en las poblaciones de hongos filamentosos. *Alternaria*, *Botrytis* y *Cladosporium* fueron los géneros más frecuentemente identificados en uvas procedentes de las regiones de Alentejo, Douro, Ribatejo y Vinhos Verdes en Portugal (Serra *et al.*, 2006), con condiciones climáticas similares a las del presente trabajo (clima mediterráneo Csa y Csb según la clasificación climática de Köppen). Serra *et al.* (2006) informaron de que la prevalencia de *Aspergillus* dependía del clima, mientras que la presencia del género *Penicillium* no se vio influida por las condiciones climáticas. García-Cela *et al.* (2015) demostraron que *Aspergillus* y *Alternaria* fueron los géneros dominantes aislados en los viñedos españoles (Csa según la clasificación climática de Köppen), mientras que los aislados de *Penicillium* representaron menos del 4% de los aislados. En concordancia con nuestros resultados, *Penicillium* fue el género dominante (por encima del 50% de las identificaciones) de mohos en uvas de la zona de Borgoña de clima oceánico, en Francia (Diguta *et al.*, 2011). Sin embargo, *Penicillium* y *Aspergillus* compartieron la dominancia (50% de las identificaciones) en uvas de 5 regiones de Francia con clima oceánico (Cfb) como Alsacia, Beaujolais, Côtes du Rhône, Languedoc y Bordelais (Sage *et al.*, 2004). Los esfuerzos para controlar la población de mohos en los viñedos suelen dirigirse a *B. cinerea* (Pertot *et al.*, 2017; Rabosto *et al.*, 2006; Rotolo *et al.*, 2017), *A. alternata* (Prendes *et al.*, 2018), especies micotoxigénicas de *Aspergillus* sección *Nigri* (Bleve *et al.*, 2006; Dimakopoulou *et al.*, 2008) y *P. expansum* (Assaf *et al.*, 2020; Godana *et al.*

Discusión

2020). Sin embargo, la relevancia de otras especies en la patogénesis y el deterioro de las uvas merece atención (Droby *et al.*, 2002; Rousseaux *et al.*, 2014). En el presente trabajo, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aspergillus* se identificaron aislados en uvas infectadas, pero *P. glabrum* fue la especie más frecuentemente identificada en varios racimos con síntomas de desarrollo de *Penicillium*, donde fue la única especie identificada. La caracterización genética de aislados de *P. glabrum* permitió identificar dos cepas diferentes. En este trabajo, la confrontación directa en placas de PDA entre las dos cepas de *P. glabrum* y levaduras dio lugar a diferentes tipos de interacciones. Se observaron efectos inhibitorios en siete de los 18 aislados de *P. terricola* y un aislado de *A. pullulans* (**Figura V.7E, V.7F**). La dependencia de la cepa de las capacidades de biocontrol está de acuerdo con hallazgos previos de aislados de *I. terricola* (sinónimo de *P. terricola*) y *H. uvarum* contra *B. cinerea* (Guzzon *et al.*, 2014). Se ha informado de la actividad antagonista de cepas pertenecientes a *I. terricola* y *A. pullulans* aisladas de viñedos contra diferentes patógenos como *A. carbonarius* y *A. niger* (Bleve *et al.*, 2006; Dimakopoulou *et al.*, 2008); *B. cinerea* (Guzzon *et al.* 2014) y *Greeneria uvicola*, responsable de la podredumbre amarga (Rathnayake *et al.* 2018). Otros aislados como *A. pullulans* L30 (**Figura V.7C**) y *Z. meyeræ* modificaron el aspecto visual del micelio de *P. glabrum* (**Figura V.7D**). Las otras especies de levaduras identificadas no mostraron efectos destacables sobre el desarrollo de *P. glabrum* o incluso fueron completamente cubiertas por micelio, a pesar de que miembros de *H. uvarum* y *P. kudriavzevii* había sido descritos previamente como agentes de biocontrol (Choińska *et al.*, 2020; Ruiz-Moyano *et al.*, 2020). Además, no se encontraron diferencias relevantes en las interacciones entre las levaduras y las dos cepas de *P. glabrum* evaluadas (M1307 y M204). Sin embargo, el cribado *in vitro* de la actividad antagonista presentó discrepancias con los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* de uvas heridas (**Figura V.7** y **Figura V.8**). Las levaduras clasificadas como “actividad neutra” por confrontación directa, *P. kudriavzevii* L18 y *H. uvarum* L35, mostraron una notable actividad antagonista en las uvas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que deben aplicarse estrategias combinadas para detectar adecuadamente la actividad antagonista.

La investigación del posible mecanismo de acción de las levaduras seleccionadas mostró que la producción de VOCs antifúngicos en placas PDA y su consiguiente efecto sobre el crecimiento de *P. glabrum* era una característica común en las levaduras seleccionadas, excepto para *Z. meyeræ* L29, que no tuvo ningún efecto sobre las tasas de

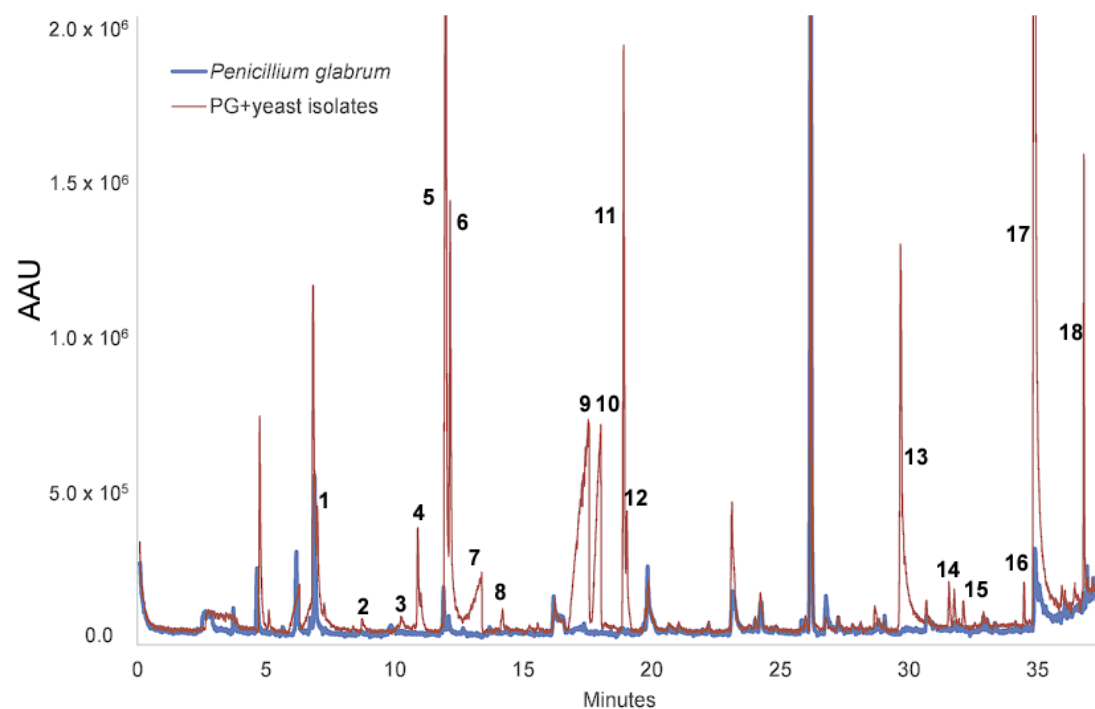
crecimiento, la fase de latencia y la reducción del diámetro de los micelios. El resto de las levaduras afectaron principalmente mediante el retraso de la fase de latencia, especialmente a *P. glabrum* M204. La **Figura V.9** muestra los compuestos volátiles resultantes del desarrollo de las cepas de *H. viticola*, *H. uvarum*, *A. pullulans* y *P. kudriavzevii*. Esta última levadura, productora de alcoholes ramificados aromáticos y sus ésteres, presentó la mayor influencia sobre el crecimiento de *P. glabrum*, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Choińska *et al.* (2020). Ésteres como el acetato de n-propilo, acetato de isoamilo, acetato de bencilo y acetato de 2-fenetilo han sido asociados con el control de *B. cinerea* (Ruiz-Moyano *et al.*, 2020). Aunque *P. kudriavzevii* L18 fue seleccionado previamente en la confrontación directa como control negativo, este aislado fue el antagonista más eficaz contra *P. glabrum* en los ensayos *in vivo*. Estos resultados señalaron que la confrontación directa no es un método de cribado adecuado para identificar levaduras productoras de antagonistas de VOCs antifúngicos.

En cuanto a la germinación de esporas, los dos aislados del género *Pichia* redujeron el tamaño del tubo germinativo de *P. glabrum*. Además, *P. terricola* L14 también inhibió la germinación de esporas. Este hecho podría estar asociado a la colonización del espacio, ya que esto se observó en la confrontación directa (**Figura V.7E**), mientras que la reducción del tamaño del tubo germinal por *P. kudriavzevii* L18 podría estar asociada a la producción de VOC antifúngicos (Arrebola *et al.*, 2010). El resto de las levaduras no modificaron la germinación de las esporas ni los tubos germinativos.

En cuanto a los otros posibles mecanismos de acción estudiados, no se observó parasitismo de células de levaduras a hifas de *P. glabrum* en la mayoría de las levaduras seleccionadas. Se observó una ligera adhesión de células de *Z. meyeriae* L29 contra ambas cepas de mohos. Estudios anteriores han demostrado que la capacidad de las hifas de los hongos parásitos está relacionada con la producción de enzimas líticas (Spadaro *et al.*, 2004). En este caso, se detectó actividad quitinasa, β -glucanasa y pectinasa para *Z. meyeriae* L29. Sin embargo, otras levaduras con las tres capacidades hidrolíticas no fueron observadas adhiriéndose a las hifas fúngicas, del mismo modo que tampoco tuvieron capacidad de parasitar las hifas las cepas *A. pullulans* L30 y L31 con intensa actividad proteolítica. Además, los resultados de los ensayos *in vivo* revelaron que las actividades enzimáticas

Discusión

no podría ser un mecanismo clave en la superficie de las frutas. Tampoco se detectaron actividades de antibiosis en ninguna levadura.



Nº of peak	Min.	Compound	Producer strain
1	6.84	Ethyl acetate	PK18, HU35
2	7.24	Isobutyl alcohol	PT14, HU35
3	10.91	Ethyl propionate	PK18
4	11.03	n-propyl acetate	PK18
5	11.95	Isoamyl alcohol	PT14, PK18, HV21, AP31, HU35
6	12.16	2-methyl-1-butanol	PT14, PK18, HV21, AP31, HU35
7	13.28	Isobutyric acid	PT14, HU35
8	14.19	Butanoic acid	PT14
9	17.44	Isovaleric acid	PT14
10	17.92	2-methylbutyric acid	PT14
11	18.91	Isoamyl acetate	PK18
12	19.03	2-methylbutyl acetate	PK18
13	29.68	Phenylethyl alcohol	PT14, PK18, AP30, AP31, HU35
14	31.56	Benzyl acetate	PK18
15	32.12	Methylphenylacetate	PT14
16	34.48	Isopentyl hexanoate	PT14
17	34.9	2-Phenethyl acetate	PK18
18	36.8	2-Phenylethyl propionate	PK18

Figura V.9. Perfil representativo de compuestos volátiles en los sistemas de doble de las placas control (*Penicillium glabrum*, línea azul) y confrontadas (*Penicillium glabrum* + levaduras; línea roja). Los números indican los compuestos asociados al crecimiento de las levaduras. La tabla relaciona el número de picos, los tiempos de retención y la identificación de los compuestos (por base de datos NIST, índice de Kovats) de las levaduras productoras

Discusión

Trabajos anteriores destacaron la importancia de la formación de biopelículas en la actividad biocontroladora de las levaduras (Lutz *et al* 2013; Spadaro y Droby., 2016), aunque este sigue siendo uno de los mecanismos de antagonismo menos conocidos. Tres levaduras, *P. terricola* L14, *Z meyeræ* L29 y *H. uvarum* L35, formaron biopelículas en ensayos *in vitro*. Esta capacidad se ha relacionado con la colonización de heridas en frutas (Parafati *et al.*, 2015). Nuestros resultados preliminares mostraron que el biofilm podría estar implicado en el biocontrol de *H. uvarum* L35, que presentó notables reducciones de la incidencia de la enfermedad en uvas heridas. Sin embargo, otros mecanismos como la inducción de resistencia en los tejidos del huésped (Carmona-Hernández *et al.*, 2019, Jamalizadeh *et al.*, 2011) podría estar asociados con una reducción del desarrollo de la enfermedad por *H. uvarum* L35.

La competencia por los nutrientes es otro mecanismo relevante del control biológico. En nuestro estudio, la presencia de hierro si modificó la acción antagonista sobre las levaduras seleccionadas. El enriquecimiento de heridas de uva con YNB aumentó la incidencia de *P. glabrum* (de 10% de infecciones a 90% de uvas inoculadas) en enfrentamientos con *P. terricola* L14, demostrando que esta levadura basa su antagonismo en la competencia por nutrientes más que en la formación de biofilm. Utilizando la misma metodología, Ruiz-Moyano *et al.* (2016) demostraron que *M. pulcherrima* L672 basaba su mecanismo en la competencia por nutrientes. La caracterización de los mecanismos de antagonismo explicó, al menos parcialmente, los resultados obtenidos en la inoculación de uvas heridas con las dos cepas de *P. glabrum*; sin embargo, algunos de los efectos observados requieren estudios en más profundidad.

V.5 Conclusiones

Durante el desarrollo de las uvas en los viñedos, las operaciones de manejo y los procesos posteriores, y durante la comercialización, las uvas son infectadas por diferentes mohos patógenos. En este trabajo, *P. glabrum* fue el moho dominante en los racimos de uvas con síntomas de enfermedad. Para controlar las infecciones y el deterioro de *P. glabrum* se realizó un cribado de posibles levaduras antagonistas. Cinco levaduras, *P. terricola* L14, *Z. meyeræ* L29, *P. kudriavzevii* L18, *H. viticola* L21 y *H. uvarum* L35 redujeron eficazmente la infección de *P. glabrum* en uvas heridas, aunque *P. terricola*, *H. viticola* y *H. uvarum* desencadenaron por sí mismas diferentes síntomas de alteración en las uvas. En el biocontrol intervinieron diferentes mecanismos, como la producción de VOC, la secreción de enzimas líticas, la formación de biofilms y la competencia por nutrientes. Finalmente, los aislados *P. kudriavzevii* L18 (productor de VOCs antifúngicos) y *Z. meyeræ* L29 (con actividades quitinasa, β -glucanasa y pectinasa y productora de biofilm *in vitro*) se proponen como agentes de biocontrol en viñedos y durante la comercialización de la uva. Hasta donde sabemos, este es el primer informe sobre el potencial de *Z. meyeræ* como agente de biocontrol.

CAPÍTULO 2.

MEJORA DE LA VIDA ÚTIL DE LA CEREZA (*PRUNUS AVIUM* L.) MEDIANTE LA APLICACIÓN COMBINADA DE ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA (MAP) Y LEVADURAS ANTAGONISTAS PARA SU EXPORTACIÓN A LARGA DISTANCIA.

VI. Capítulo 2. Mejora de la vida útil de la cereza (*Prunus avium* L.) mediante la aplicación combinada de envasado en atmósfera modificada (MAP) y levaduras antagonistas para su exportación a larga distancia.

VI.1 Resumen

En la última década existe un creciente interés en reducir el uso de fungicidas químicos para el control del deterioro postcosecha de la fruta. En la búsqueda de nuevas alternativas seguras, la aplicación combinada de agentes de biocontrol y el envasado en atmósfera modificada pasiva (MAP, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una estrategia prometedora para extender la calidad de la fruta. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la aplicación combinada de MAP y dos levaduras antagonistas, *Metschnikowia pulcherrima* L672 y *Pichia kudriavzevii* PK18, en la vida útil de cerezas. Para ello, parámetros microbiológicos, fisicoquímico y de calidad general de la fruta de lotes tratados con levaduras antagonistas se comparó con un lote de control sin aplicación de levaduras y un lote al que se aplicó un fungicida sintético (fludioxonil (Scholar®)).

La composición de la atmósfera del envase y las características fisicoquímicas mostraron valores similares entre los diferentes lotes durante el almacenamiento en frío. Sin embargo, interesantemente, la combinación de MAP con las levaduras antagonistas *M. pulcherrima* L672 y *P. kudriavzevii* PK18 aumentó el control del deterioro microbiológico con resultados comparables a la aplicación de fludioxonil. Además, estos lotes experimentaron una ligera disminución en compuestos volátiles asociados con el aroma de fruta fresca, mientras que en el lote de control se observó un aumento de aromas de fruta alterada. El mismo efecto de control del deterioro se observó durante el período de vida útil. Estos resultados mostraron el efecto positivo de la combinación de levaduras antagonistas y MAP, obteniendo resultados similares en términos de control del deterioro microbiológico y calidad fisicoquímica a lote con aplicación de fludioxonil.

VI.2 Material biológico y diseño experimental

La evaluación del efecto sinérgico del envasado en atmósferas modificadas pasivas (MAP) junto con levaduras antagonistas se realizó en cerezas (*Prunus avium* L.) de la variedad. 'Burlat'. Las cerezas fueron suministradas por la Agrupación de Cooperativas del Valle del Jerte (Cáceres, España) después de su selección por tamaño, color, madurez y ausencia de síntomas de alteración. Las cerezas fueron trasladadas en refrigeración (<4°C) a la planta piloto de la Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura (Badajoz) para su procesado.

En el ensayo se utilizaron dos cepas de levadura previamente seleccionadas por el grupo de Calidad y Microbiología de Alimentos (CAMIALI) por su potencial antagonista, *M. pulcherrima* L672 (Ruiz-Moyano *et al.*, 2016; MPL 672), y *P. kudriavzevii* PK18 (Capítulo 1; PK18). Las dos levaduras fueron crecidas previamente al ensayo en caldo YPD (Condalab, Madrid, España) a 25 °C en agitación a 100 rpm durante 48 h. Las levaduras se concentraron mediante centrifugación y la concentración de la solución de levaduras fue determinada con cámara de Neubauer de MARIENFELD, tal y como se describe en el apartado V.2.4.1 del capítulo 1.

El envasado de las cerezas se realizó simulando el procedimiento utilizado por la Agrupación de Cooperativas del Valle del Jerte (Cáceres, España). Para ello, en primer lugar, las cerezas fueron higienizadas mediante inmersión durante 3 min en agua a 5°C conteniendo una concentración de hipoclorito sódico de 50 mg/L en un hidrocooler de planta piloto (Kronen, DS1000, Alemania) (**Figura VI.1**). Posteriormente, las cerezas se introdujeron en agua a 5°C estéril durante 1 min para eliminar posibles residuos de hipoclorito sódico. Una vez higienizadas las cerezas fueron sometidas a los diferentes tratamientos (Lotes) que se describen a continuación:

1. **Fludioxonil**: tratamiento con fungicida sintético comercial autorizado en postcosecha. Las cerezas fueron tratadas por inmersión en solución de fludioxonil (Scholar 230SC (2,5 mL/L); Syngenta Crop Protection Inc., NC, EUA) en agua a 5°C durante 5 minutos.
2. **MPL 672**: tratamiento con levadura antagonista *M. pulcherrima* L672. Las cerezas fueron tratadas por inmersión en solución de la levadura antagonista a 10⁸ células/mL en agua a 5°C durante 5 minutos.

3. **PK 18:** tratamiento con levadura antagonista *P. kudriavzevii* PK18. Las cerezas fueron tratadas por inmersión en solución de la levadura antagonista a 10^8 células/mL en agua a 5°C durante 5 minutos.
4. **Control:** tratamiento con agua a 5°C durante 5 minutos.

Tras los tratamientos, las cerezas fueron secadas inmediatamente al aire a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez secas, las cerezas se envasaron en bolsas microperforadas de atmósfera modificada pasiva (Xtend 815-CH 98 para cerezas, de 2,5 kg; StePac, Israel) de aproximadamente 2,5 kg, cerradas con bandas de goma, y colocadas en cajas de cartón abiertas. Todas las bolsas de cada lote fueron identificadas y pesadas.



Figura VI.1. Cerezas siendo sometidas a higienización en agua a 5°C en hidrocóoler (Kronen, DS1000, Alemania).

Las bolsas de los diferentes tratamientos realizados se almacenaron en una cámara frigorífica a 2°C con una humedad relativa de aproximadamente 90-95% durante 40 días. En total, por cada tratamiento se envasaron 24 bolsas. A lo largo del almacenamiento se realizaron 4 muestreos a los 5, 12, 25 y 40 días en lo que se seleccionaron de forma aleatoria 6 bolsas por tratamiento. Tres de ellas se abrieron y se almacenaron a 25°C durante 2 días para simular su almacenamiento el comercio minorista, considerando este periodo como la vida útil (SL). El resto, se analizaron inmediatamente (CS). Todas las determinaciones se hicieron por cada día de muestreo en tres bolsas diferentes por lote, realizando cada determinación por bolsa en duplicado. En la **Figura VI.2** se muestra de

Material biológico y diseño experimental

forma esquemática los tratamientos realizados, muestreos durante el almacenamiento y determinación de parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y compuestos aromáticos realizados.

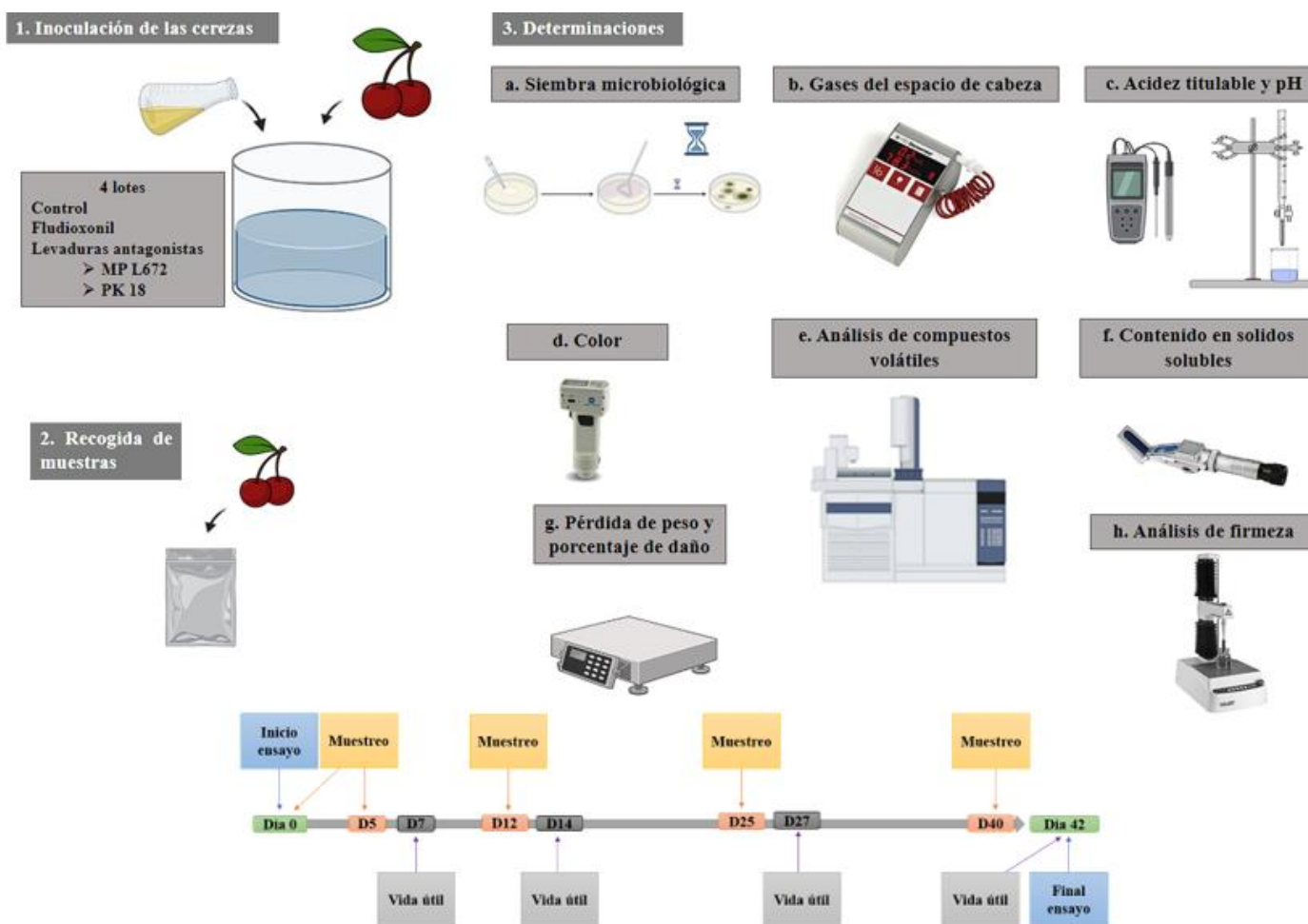


Figura VI.2. Esquema general del diseño experimental del ensayo de envasado de cerezas en MAP combinado con tratamientos de antifúngico sintético y levaduras antagonistas junto con los muestreos realizados durante el ensayo (Elaboración propia).

VI.2.1 Determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas

VI.2.1.1 Análisis microbiológico y monitorización de la implantación de las levaduras antagonistas

La calidad microbiológica de las cerezas envasadas en cada lote se determinó muestreando de forma aleatoria 20 cerezas en cada bolsa, las cuales fueron analizadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.4.1 del capítulo 1. En concreto se determinó los recuentos de mohos y levaduras en agar de dextrosa de patata (PDA, Pronadisa, Barcelona, España) acidificado y agar Rosa de Bengala cloranfenicol (RBC, Condalab, Madrid, España) tras la incubación de las placas a 25°C durante 96 h y bacterias aerobias mesófilas en agar para métodos estándar (PCA, Condalab) tras la incubación de las placas a 30°C durante 48 h.

La monitorización de las levaduras antagonistas utilizadas en los tratamientos de los lotes MPL672 y PK18 se realizó mediante el aislamiento en las diluciones más elevadas de colonias de levadura con morfologías compatibles con la especie inoculada mediante siembra en agar PDA por agotamiento discontinuo hasta obtener cultivos puros. Igualmente, en los lotes de control y fludioxonil se aislaron de las diluciones más elevadas las colonias de levadura de las morfologías más representativas. Una vez aisladas, la identificación de los aislados a nivel de especie se realizó por amplificación mediante PCR y posterior secuenciación de la región ITS1-5,8S rRNA-ITS4 tal y como se describe en el apartado V.2.3 del capítulo 1. En los lotes de control y de fludioxonil se aislaron e identificaron las colonias de levadura de las morfologías más representativas como se ha explicado anteriormente.

VI.2.1.2 Determinación de la composición de gases del espacio de cabeza

La concentración de O₂ y CO₂ dentro de las bolsas de envasado de los diferentes lotes de cereza fue monitorizada mediante un analizador de gases (Checkpoint, PBI Dansensor, Dinamarca) modelo Checkmate 3 headspaces gas analyser, equipado con una aguja que se insertaba a través de un septum en el exterior de la bolsa. Los resultados se expresaron en kPa de O₂ y kPa de CO₂. En cada día de muestreo se midieron 3 bolsas distintas por lote. Esta determinación solo se realizó en el muestreo de evolución (CS).

VI.2.1.3 Determinación de la pérdida de peso y porcentaje de daño

El porcentaje de pérdida de peso durante el período de almacenamiento en frío debido a la transpiración y respiración de las cerezas se determinó tal como demuestra la **Ecuación V.1** comparando el peso registrado tras el envasado de la bolsa a día (P_0) con respecto al peso de la bolsa en el día de muestreo (P_t). Así, el porcentaje de pérdida de peso fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = (P_0 - P_t/P_0) \times 100 \quad (\text{Ec. VI.1})$$

Donde P_0 es el peso de inicial de la bolsa en el día 0 y P_t el peso final de la bolsa en cada día de muestreo.

En relación con el porcentaje de daños, se consideró como daño en el fruto la aparición de podredumbre causada por mohos, siendo visible el micelio de este. Otros daños considerados fueron por ejemplo daños en la piel (cortes), daño mecánico podredumbre no miceliales y fermentaciones durante el periodo de vida útil. El porcentaje de daños fue determinando en 50 frutos tomados de forma aleatoria de cada bolsa mediante la relación del peso de los frutos visiblemente dañados con respecto al peso inicial, calculándose mediante la **Ecuación V.2**:

$$\text{Porcentaje de daño (\%)} = (W_d/W_0) \times 100 \quad (\text{Ec. VI.2})$$

Donde W_d es el peso de las frutas dañadas y el W_0 el peso de la fruta envasada.

VI.2.1.4 Color de la piel y la pulpa

Para la determinación del color se muestrearon de forma aleatoria 20 cerezas por bolsa a las cuales se les evaluó el color en la piel y pulpa utilizando un espectrofotómetro portátil CR-600d (Konica Minolta, Osaka, Japón). En cada fruto se realizaron tres mediciones en puntos equidistantes de la región ecuatorial de cada fruto. Tras la determinación del color de la piel, los frutos se cortaron para analizar el color de la pulpa. Los resultados se expresaron en las coordenadas espaciales CIELab. L^* indica la luminosidad (varía de 0 (blanco) a 100 (negro)), a^* coordenadas rojo/verde (+a indica rojo (60); -a indica verde (-60)), b^* coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo (60), -b indica azul (-60)). Además, a partir de las coordenadas a^* y b^* se determinaron las

Material biológico y diseño experimental

coordenadas polares: el ángulo de tono (h^*) y el croma (C^*). El ángulo de tono (h^*), calculado como $\arctg(b^*/a^*)$, expresa el matiz del color, y los valores se definen como sigue (valores de 0° a 360°): rojo-violeta: 0° ; amarillo: 90° ; azul-verde: 180° ; azul: 270° . El croma (C^*), obtenido como $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, siendo su valor la distancia desde el eje de luminosidad (L^*), el cual comienza a 0 en el centro. El C^* es una medida de la cromaticidad, que define la pureza o saturación del color. Esta determinación se realizó durante el periodo de almacenamiento y en el periodo de vida útil.

VI.2.2 Determinación de la firmeza

La firmeza se determinó en 10 cerezas seleccionadas de forma aleatoria en cada bolsa por cada día de muestreo. Posteriormente se realizó una evaluación de la firmeza mediante un texturómetro modelo TAXT2i (STABLE MICRO SYSTEM), mediante un ensayo de compresión en el que se utilizó un 2% de deformación siguiendo la metodología descrita por Serradilla *et al.* (2011). El resultado fue expresado en fuerza máxima (N) y la pendiente (N/mm) de la curva de compresión. Esta determinación se realizó durante el periodo de almacenamiento y en el periodo de vida útil.

VI.2.2.1 Determinación de la acidez titulable, pH y sólidos solubles totales

Se realizó un homogenizado a partir de 25 frutos utilizando un homogeneizador Omni Mixer (Omni International, Marietta, GA, EE. UU.). Los frutos fueron muestreados de forma aleatoria de cada bolsa, tanto en periodo de almacenamiento como en el periodo de vida útil.

La acidez titulable (AT) y el pH se determinaron a partir de 5 g de homogenizado diluido con 50 mL con agua destilada. Los valores de AT y pH en cada muestra se realizaron con un valorador automático 716 DMS Titrino (Metrohm, Herisau, Suiza). Las muestras se valoraron con 0,1 mol/L de NaOH hasta pH 8,1. Los resultados de AT se expresan como g de ácido málico por 100 g de peso fresco.

La cantidad de sólidos solubles totales (SST) en los homogenizados se determinó con un refractómetro digital METTLER TOLEDO modelo Refracto 30GS. Los resultados se expresan como $^\circ$ Brix.

VI.2.2.2 Análisis de compuestos volátiles

Para el análisis del perfil de compuestos volátiles, en cada día de muestreo (periodo de almacenamiento y vida útil) se pesó aproximadamente 1 gramo del homogenizado obtenido de cada bolsa tal y como se describe en el apartado anterior en un vial con espacio de cabeza de 10 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y se selló con un septo de PTFE-butilo (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis. La extracción de los compuestos volátiles se realizó mediante microextracción en fase sólida (SPME) con una fibra recubierta de CarboxenTM/polidimetilsiloxano (Supelco, Bellefonte, PA) de 10 mm de longitud y 100 μm de grosor. Tras la perforación del septum con la fibra, la completa extracción de los volátiles se realizó en un baño a 40°C durante 45 min. Tras la extracción el análisis se realizó en un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890 acoplado a un detector masas Agilent modelo 5973 GC/MS siguiendo las condiciones cromatográficas descrita por Serradilla *et al.* (2012). La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante su espectro de masas, así como por su índice Kovacs calculado a partir del tiempo de retención del pico con respecto a los patrones.

VI.2.3 Tratamiento de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico de la composición de los gases del espacio de cabeza, el % de pérdida de peso, los recuentos microbiológicos, el % de daños, pH, acidez titulable, contenido de solubles totales, firmeza y compuestos volátiles se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías utilizando el programa SPSS para Windows, 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los datos de % de pérdida de peso y % de daños se convirtieron en valores angulares de Bliss antes del análisis. Cuando el efecto de la interacción es significativo ($p \leq 0,050$) se procedió a la realización de un análisis de comparación de medias por el método Tukey que determina la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta sea estadísticamente significativa.

VI.3 Resultados

VI.3.1 Impacto de los tratamientos durante el almacenamiento en frío

Los lotes MAP experimentaron una disminución pronunciada de O_2 en el día 5, como se muestra en la **Figura VI.3A**, aunque no se encontraron diferencias estadísticas ($p \geq 0,050$). Los valores medios del lote de control fueron superiores ($8,03 \pm 2,35$ kPa) a los de los demás lotes, siendo los valores medios más bajos, $4,97 \pm 2,05$ kPa, en el lote PK18. Estos resultados se mantuvieron tras 12 días. Sin embargo, la presión parcial de O_2 disminuyó tras 25 y 40 d de almacenamiento en frío, con valores que oscilaron entre $0,70 \pm 0,17$ kPa O_2 en el lote PK18 y $1,76 \pm 1,07$ kPa O_2 en el lote MPL672 ($p \geq 0,050$). La evolución de la concentración de CO_2 presentó valores similares en todos los lotes ($p \geq 0,050$; **Figura VI.3B**). Al inicio de la conservación en frío, se observaron valores medios de $5,90 \pm 0,20$ a $7,10 \pm 0,17$ kPa de CO_2 en los lotes PK18 y MPL672, respectivamente. Por el contrario, al final de la conservación en frío, se encontraron valores de $8,97 \pm 0,27$ a $9,42 \pm 0,25$ kPa de CO_2 en los lotes fludioxonil y PK18, respectivamente.

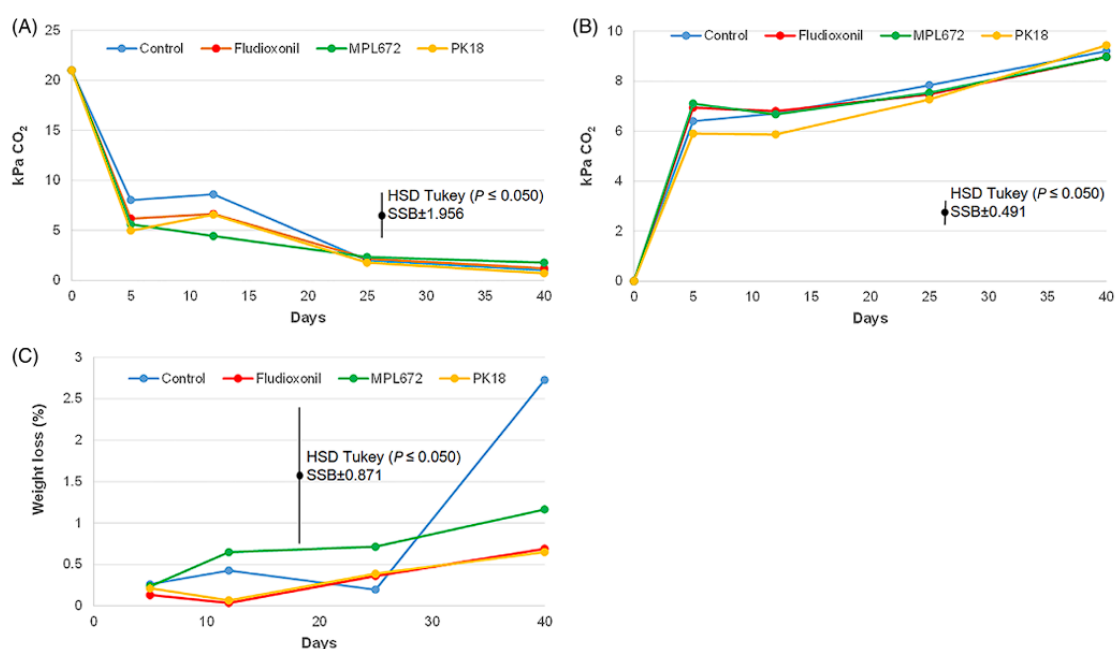


Figura VI.3. Presiones parciales (A) kPa O_2 y (B) kPa CO_2 y (C) porcentajes de pérdida de peso de cerezas 'Burlat' envasadas en atmósferas modificadas pasivas a $2^\circ C$ y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672: en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18: en amarillo), fludioxonil (en rojo) y control (en azul). HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey); SSB: barra de significación estadística.

Los lotes tratados con levaduras antagonistas y fludioxonil mostraron una pérdida de peso similar, con una pérdida porcentual de alrededor del 0,2 % a los 5 días y oscilando entre el 0,64 % y el 1,16 % a los 40 días, sin diferencias estadísticas. Sin embargo, el control mostró un aumento significativo de la pérdida de peso ($p \leq 0,050$) tras 25 d de almacenamiento ($2,72 \pm 2,36$ % de pérdida de peso). La evolución de la pérdida de peso fue bastante similar entre los lotes ($p \geq 0,050$) hasta los 25 días de almacenamiento, con porcentajes inferiores al 0,75 % (**Figura VI.3C**). Posteriormente, en la fase final de almacenamiento, la pérdida de peso fue significativamente menor en los lotes de fludioxonil y PK18 ($p \leq 0,050$).

Los recuentos microbianos se muestran en la **Figura VI.4**. Los microorganismos totales aerobios mesófilos mostraron diferencias al inicio del almacenamiento, con recuentos más bajos ($p \leq 0,050$) en el lote control (valores de $2,41 \pm 0,36 \log_{10}$ UFC g^{-1}) (**Figura VI.4A**).

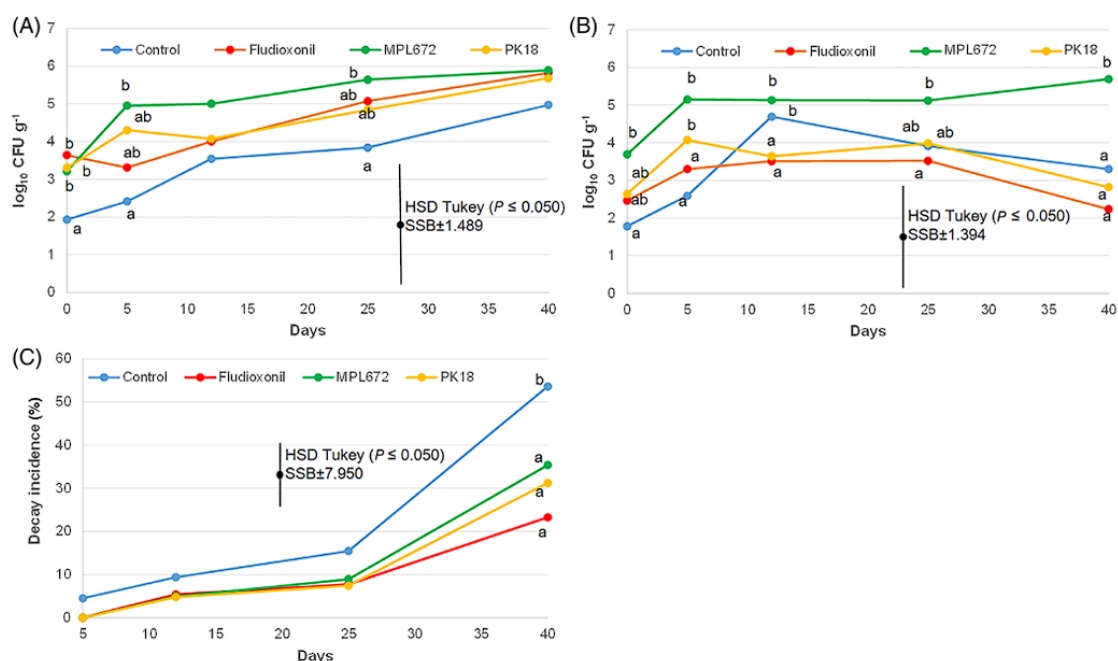


Figura VI.4. Recuentos de (A) microorganismos mesófilos aerobios totales, (B) levaduras y (C) porcentaje de incidencia de la podredumbre en cerezas 'Burlat' envasadas en atmósfera pasiva modificada a 2°C y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo) y control (en azul). HSD Tukey: diferencia significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística.

Resultados

Los lotes inoculados con levadura presentaron recuentos de microorganismos mesófilos aerobios totales (TAM) en torno a $3,3 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$. En general, los recuentos de MAT aumentaron durante el almacenamiento hasta niveles de aproximadamente $5-6 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ al final de este, sin diferencias estadísticas entre lotes ($p \geq 0,050$) (**Figura VI.4A**). La **Figura VI.4B** muestra los recuentos de levaduras a lo largo del almacenamiento. En general, la evolución de los recuentos de levaduras fue paralela a la de los recuentos de TAM, excepto al final del almacenamiento. A los 40 días, se observó una disminución de los recuentos de levaduras en los lotes control, fludioxonil y PK18, con valores finales de $3,30 \pm 0,56$, $2,23 \pm 0,68$ y $2,28 \pm 0,41 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, el lote MPL672 mantuvo recuentos de levaduras similares a los del recuento MAT tras 40 días de almacenamiento en frío. Por último, los recuentos de mohos estuvieron por debajo del umbral de detección ($2 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$) para los lotes fludioxonil, PK18 y MPL672 durante el almacenamiento en frío, mientras que el control tampoco alcanzó $2,00 \pm 1,56 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ (datos no mostrados).

El análisis de la morfología de las colonias mostró el predominio de los inóculos durante el almacenamiento en frío. La identificación por secuenciación genómica de los aislados de los lotes inoculados con levadura confirmó la presencia de las especies *M. pulcherrima* y *P. kudriavzevii* respectivamente. En los lotes no inoculados, se observaron principalmente morfologías compatibles con especies de mohos similares a las levaduras, que se identificaron molecularmente como *A. pullulans* y *Cystofilobasidium* spp.

La evolución de las podredumbres de las cerezas se muestra en la **Figura VI.4C**. El lote control mostró un $4,50 \pm 0,54$ % de podredumbres a los 5 días y aumentó hasta un $53,60 \pm 16,32$ % a los 40 d. Asimismo, en los demás lotes, el porcentaje de podredumbre aumentó durante los primeros 25 días de almacenamiento de forma similar al control. Sin embargo, a los 40 días lotes tratados presentaron valores medios significativamente ($p \leq 0,050$) inferiores. Concretamente, a los 40 días, el porcentaje de pudrición fue de $23,36 \pm 3,96$, $35,37 \pm 3,57$ y $31,31 \pm 6,98$ % para los lotes fludioxonil, MPL672 y PK18, respectivamente.

En cuanto a las características fisicoquímicas de las cerezas variedad 'Burlat' (**Tabla VI.1**), fueron $19,20 \pm 0,06$ % de SST, pH de $4,04 \pm 0,04$; $0,63 \pm 0,02$ g de ácido málico por 100 g de peso fresco, y $2,26 \pm 0,41$ N mm⁻¹ al inicio del almacenamiento.

Tabla VI.1. Evolución de los Sólidos Solubles Totales (SST), pH, acidez triturable (AT) y dureza de las cerezas tratadas durante el almacenamiento en frío (2°C).

Parámetros	Dia	Control		Fludioxonil		MPL672		PK18		P
		Media	DS ¹	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
SST (°Brix)	D5	18,17	1,37	19,55	0,82	19,20	0,75	19,75	0,54	<0,001
	D12	18,72	0,71	19,22	0,39	18,87	1,21	18,10	0,80	
	D25	20,63	0,25	18,67	0,05	17,78	0,56	19,72	0,96	
	D40	19,77	1,66	18,17	0,56	17,33	0,27	20,42	0,45	
	Total	19,29 ^{bc2}	1,28	18,90 ^b	0,73	18,29 ^a	1,06	19,49 ^c	1,10	
pH	D5	4,16	0,06	4,16	0,02	4,21	0,04	4,24	0,03	0,014
	D12	4,08	0,07	4,16	0,02	4,17	0,06	4,24	0,07	
	D25	4,22	0,05	4,21	0,06	4,26	0,01	4,30	0,04	
	D40	4,34	0,08	4,32	0,10	4,36	0,14	4,29	0,04	
	Total	4,14 ^a	0,14	4,16 ^{ab}	0,14	4,21 ^{bc}	0,15	4,21 ^c	0,12	
AT (g ácido málico/100 g FW)	D5	0,51	0,04	0,51	0,03	0,48	0,02	0,52	0,02	0,003
	D12	0,50	0,03	0,52	0,03	0,50	0,04	0,51	0,04	
	D25	0,45	0,03	0,46	0,02	0,44	0,01	0,46	0,02	
	D40	0,37	0,02	0,41	0,04	0,37	0,03	0,42	0,01	
	Total	0,49 ^b	0,09	0,47 ^b	0,05	0,44 ^a	0,06	0,47 ^b	0,05	
Dureza (Nmm ⁻¹)	D5	2,52	0,50	2,45	0,42	3,04	0,52	3,49	0,60	<0,001
	D12	2,81	0,43	2,92	0,49	2,97	0,54	3,31	0,62	
	D25	2,75	0,89	2,63	0,67	2,79	0,65	3,48	0,82	
	D40	2,04	0,62	1,96	0,91	1,72	0,63	2,00	0,41	
	Total	2,52 ^a	0,70	2,48 ^a	0,73	2,62 ^a	0,79	3,06 ^b	0,88	

¹DS: desviación estándar.

²Valores medios con letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,050$).

Resultados

En general, los SST no se vieron afectados durante el almacenamiento. Sin embargo, el lote PK18 mostró mayores ($p \leq 0,050$) SST (valores medios de $19,49 \pm 1,10$ % SST) que fludioxonil (valores medios de $18,90 \pm 0,73$ % SST) y MPL672 ($18,29 \pm 1,06$ % SST). Los valores de pH aumentaron durante el almacenamiento, con diferencias entre lotes. Los valores globales de pH fueron significativamente más altos en los lotes inoculados con levaduras ($4,21 \pm 0,12$ en PK18; $4,21 \pm 0,15$ en MPL672) que en el lote de control ($4,14 \pm 0,14$). Del mismo modo, el AT disminuyó durante el almacenamiento en frío, con valores más bajos en el lote MPL672 ($0,44 \pm 0,06$ g de ácido málico/100 g de peso fresco; $p \leq 0,050$). Con respecto a la firmeza, en general se mantuvo estable durante los primeros 25 días de almacenamiento en todos los lotes. Sin embargo, se observó un descenso drástico después de 40 días. Los lotes inoculados con levadura mostraron valores medios más elevados, especialmente PK18 con el valor estadístico más alto ($p \leq 0,001$) de $3,06 \pm 0,88$ N mm⁻¹.

En la **Figura VI.5** se muestra la evolución del color de las cerezas durante el almacenamiento en MAP. La luminosidad de la piel (L^*) aumentó a los 5 días de almacenamiento en todos los lotes, aunque el lote control mostró los valores más bajos ($p \leq 0,050$). Después, los valores de L^* disminuyeron a lo largo del almacenamiento hasta valores de ~ 5 unidades. Los análisis globales indicaron que la piel de los lotes inoculados con levaduras mostró un brillo superior al del control ($p \leq 0,050$). La cromaticidad de la piel (C^*) tendió a mantenerse durante todo el almacenamiento. Sin embargo, se observó un fuerte aumento a los 12 días de almacenamiento para el lote PK18, alcanzando $32,72 \pm 15,94$ unidades ($p \leq 0,050$). El ángulo de tono (Hue^*) mostró grandes fluctuaciones a lo largo del almacenamiento y entre lotes. Los valores más altos se observaron a los 5 y 12 días para los lotes MPL672 y fludioxonil, respectivamente. Con respecto al color objetivo de la pulpa durante el almacenamiento, se observaron valores similares para L^* , C^* y Hue^* en todos los lotes ($p \geq 0,050$). La luminosidad (L^*) mostró una ligera disminución del quinto día al día 40; de valores de 15-20 a valores de 8-12 unidades. La C^* de la pulpa se situó en torno a 40 a los 5 y 40 días de almacenamiento, mostrando un ligero aumento en el punto de muestreo intermedio. Por último, Hue^* disminuyó a lo largo del almacenamiento de ~ 40 a 25-30 a los 40 días de almacenamiento.

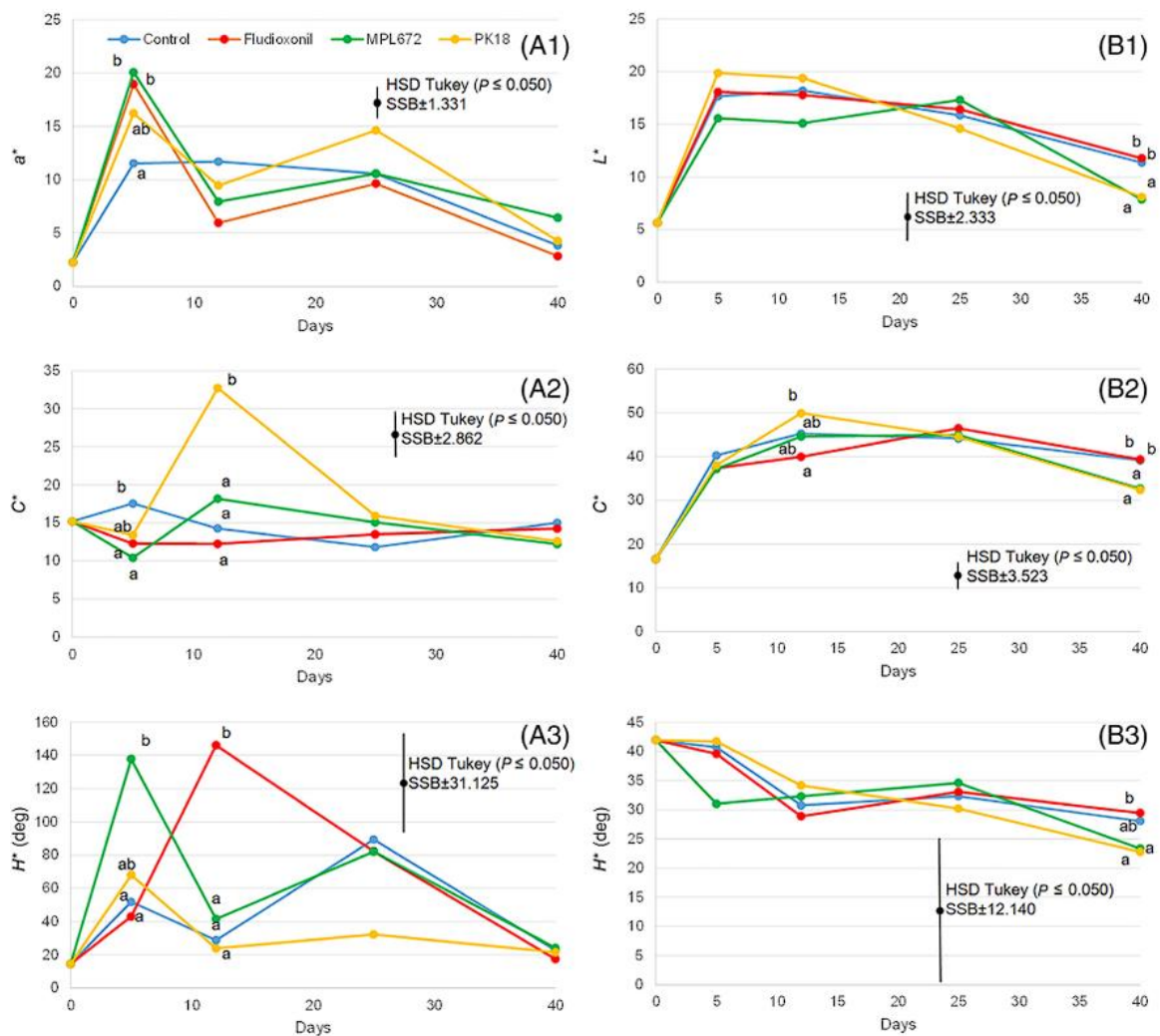


Figura VI.5. Parámetros de color: (A) luminosidad L^* , (B) cromaticidad C^* , y (C) ángulo de tono H^* de (1) la piel y (2) la pulpa de cerezas "Burlat" envasadas en atmósfera modificada a 2 °C y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo) y control (en azul). HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística.

Finalmente se evaluó el efecto de los tratamientos sobre los compuestos volátiles de las cerezas a lo largo del almacenamiento en frío (**Tabla VI.2**). A los 25 días, no se observaron cambios significativos en los niveles de hexanal, 2-hexenal, 1-hexanol y benzaldehído, aunque el benzaldehído aumentó notablemente desde el inicio del ensayo. Al día 40, en los lotes tratados con levadura y fludioxonil, hexanal y [E]-2-hexenal disminuyeron significativamente, mientras que el benzaldehído aumentó en el lote control en comparación con los demás lotes.

Resultados

Tabla VI.2. Contenido de compuestos volátiles marcadores durante el almacenamiento en frío de las cerezas 'Burlat' en MAP.

		Area Arbitrary Units (AAU)							
Dias	Lote	Hexanal		[E]-2-Hexenal		1-Hexanol		Benzaldehido	
		Media	DS ¹	Media	DS	Media	DS	Media	DS
0	C	617 ^{a2}	187	1631 ^{b, c}	450	605 ^a	240	847 ^c	1058
25 d (2°C)	C	403 ^b	36	1548 ^{b, c}	472	580 ^{a, b}	107	3062 ^c	1645
	MPL672	478 ^{a, b}	41	1690 ^{b, c}	603	564 ^{a, b}	416	3608 ^c	1579
	PK18	453 ^{a, b}	136	1880 ^{b, c}	744	502 ^{a, b}	153	3884 ^{b, c}	1169
	Flud	399 ^{b, c}	91	1367 ^{b, c}	449	582 ^{a, b}	210	2325 ^c	744
40 d (2°C)	C	771 ^a	282	4010 ^a	2201	245 ^{b, c}	23	13624 ^a	3905
	MPL672	156 ^c	76	731 ^c	669	139 ^{b, c}	120	487 ^{b, c}	2769
	PK18	398 ^{b, c}	206	1702 ^{b, c}	1116	180 ^{b, c}	159	5244 ^{b, c}	3247
	Flud	310 ^c	69	2316 ^b	790	252 ^{b, c}	62	7360 ^b	1852

¹DS: Desviación estándar.

²Valores medios con letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,050$).

VI.3.2 Impacto del tratamiento en la vida útil

La **figura VI.6** muestra el impacto de la vida útil en los recuentos microbianos (2 días a 25 °C con las bolsas MAP abiertas) tras el almacenamiento en frío. Los recuentos medios de TAM aumentaron progresivamente en cada día de muestreo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los lotes ($p \geq 0,050$). Entre los lotes, los recuentos medios del lote MPL672 fueron siempre los más altos en todos los puntos de muestreo (**Figura VI.6A**). En cuanto a los recuentos de levaduras, los lotes inoculados con levaduras mostraron recuentos más altos que las cerezas no inoculadas ($p \leq 0,050$), excepto en el punto de muestreo final de la vida útil (**Figura VI.6B**). El lote MPL672 mostró los recuentos medios más elevados, con valores que oscilaron entre $5,45 \pm 0,46 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a los 5 días de CS + 2 SL y $6,18 \pm 0,95 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a los 25 días de CS + 2 SL (**Figura VI.6B**).

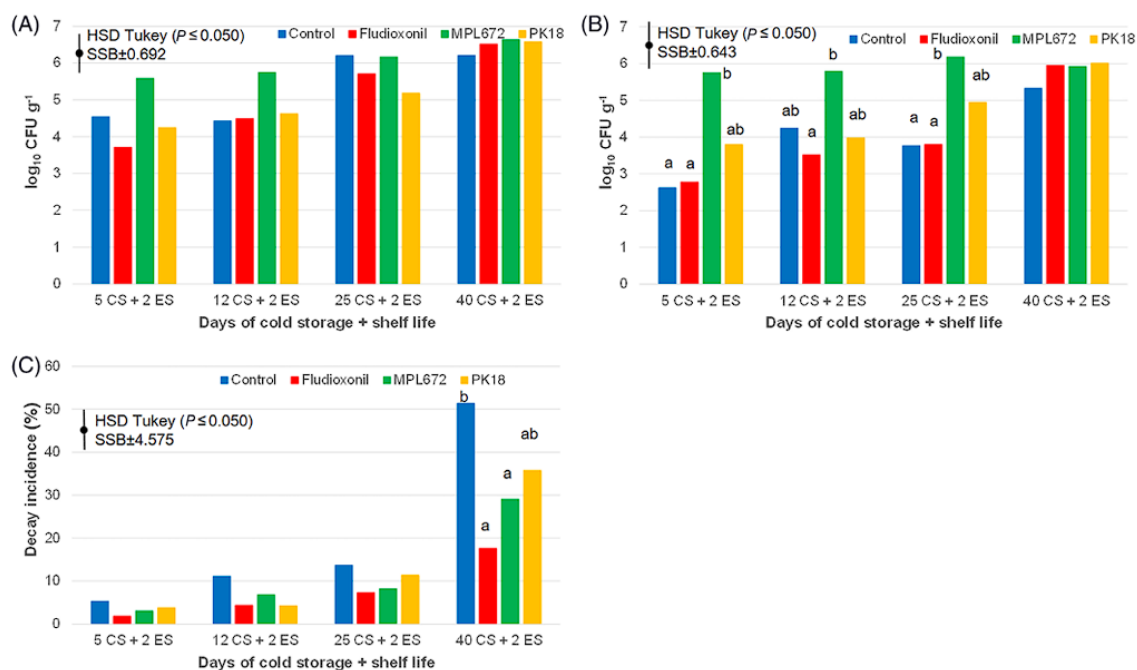


Figura VI.7. Recuentos de (A) microorganismos mesófilos aerobios totales (TAM), (B) levaduras, y (C) porcentaje de incidencia de pudrición de cerezas 'Burlat' envasadas en atmósfera modificada pasiva y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo), y control (en azul). Las cerezas se almacenaron a 2 °C y se colocaron 2 días a 25 °C para simular su vida útil. HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística.

Resultados

La **Figura VI.6C** muestra el porcentaje de deterioro microbiano tras la simulación de vida útil. El lote control mostró los valores medios más altos de deterioro en los diferentes puntos de muestreo de la vida útil, mientras que el lote de fludioxonil mostró los más bajos. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticas en el punto de muestreo final, donde los lotes de fludioxonil ($17,58 \pm 4,58$ %) y MPL672 ($29,06 \pm 3,16$ %) redujeron el deterioro ($p \leq 0,050$) en comparación con el lote de control ($51,36 \pm 8,35$ %).

En la **Tabla VI.3**, podemos observar los parámetros fisicoquímicos analizados durante la vida útil. En estos parámetros no se encontraron diferencias significativas en los SST en los distintos puntos de muestreo de la vida útil ($p \geq 0,050$), con valores medios en torno al 10-22 % de SST. Los valores medios globales a lo largo de la vida útil del lote PK18 mostraron valores más altos (21,07 %TSS, $p=0,001$) que el resto de los lotes. En general, el pH aumentó a lo largo de la vida útil desde valores de pH en torno a 4,2 hasta 4,5. En el caso del lote MPL672, mostró los valores medios globales más altos ($p=0,048$), alcanzando valores de $4,71 \pm 0,40$ a los 40 días de CS + 2 SL; mientras que el lote fludioxonil mostró el valor medio global más bajo ($\text{pH}=4,23 \pm 0,14$). Contrariamente a los valores de pH, el TA disminuyó a lo largo de los diferentes días de muestreo desde valores de 0,50-0,55 a 0,32-0,38 mg de ácido málico/100 g de peso fresco. El lote PK18 mostró la media global de AT más alta ($0,47 \pm 0,18$ mg de ácido málico/100 g de peso fresco; $p \leq 0,001$). Finalmente, los tratamientos no afectaron a la firmeza a lo largo de la vida útil, observándose una disminución de la firmeza en todos los lotes a lo largo de la simulación de SL, desde valores en torno a $1,90 \text{ N mm}^{-1}$ a los 5 días CS +2 SL hasta $1,30 \text{ N mm}^{-1}$ a los 40 CS + 2 SL.

Tabla VI.3. Evolución de los sólidos solubles totales (SST), pH, acidez triturable (AT) y firmeza de las cerezas tratadas durante su vida útil.

Parámetro	Día	Control		Fludioxonil		MP L672		PK18		<i>p</i>
		Media	DS ¹	Media	DS	Media	DS	Media	DS	
TSS (°Brix)	D5+2	18,98	0,80	20,00	0,86	19,45	0,39	21,55	1,62	0,001
	D12+2	21,00	0,7	20,67	2,34	22,12	1,78	20,80	1,84	
	D25+2	18,93	0,65	19,20	1,23	18,27	0,91	20,90	4,22	
	D40+2	19,96	1,16	18,18	0,65	18,05	0,50	21,07	0,22	
	Total	19,72 ^{a2}	1,18	19,51 ^a	1,63	19,47 ^a	1,92	21,07 ^b	2,30	
pH	D5+2	4,21	0,04	4,17	0,02	4,25	0,03	4,22	0,05	0,048
	D12+2	4,13	0,10	4,11	0,04	4,11	0,03	4,11	0,04	
	D25+2	4,25	0,05	4,22	0,02	4,26	0,04	4,26	0,06	
	D40+2	4,46	0,13	4,46	0,09	4,71	0,40	4,50	0,08	
	Total	4,26 ^{a, b}	0,15	4,23 ^a	0,14	4,33 ^b	0,30	4,27 ^{a, b}	0,16	
AT (g ácido málico/100 g FW)	D5+2	0,50	0,02	0,52	0,03	0,51	0,04	0,55	0,02	<0,001
	D12+2	0,48	0,01	0,52	0,06	0,53	0,03	0,55	0,03	
	D25+2	0,40	0,01	0,41	0,01	0,38	0,04	0,42	0,03	
	D40+2	0,36	0,04	0,36	0,01	0,32	0,01	0,38	0,02	
	Total	0,43 ^a	0,06	0,45 ^a	0,08	0,43 ^a	0,09	0,47 ^b	0,08	
Dureza (Nmm ⁻¹)	D5+2	1,95	0,39	1,95	0,46	1,97	0,34	1,81	0,40	0,236
	D12+2	1,61	0,38	1,80	0,36	1,71	0,39	1,50	0,37	
	D25+2	1,40	0,36	1,42	0,38	1,53	0,47	1,41	0,24	
	D40+2	1,29	0,67	1,38	0,81	1,21	0,31	1,34	0,46	
	Total	1,42	0,50	1,62	0,56	1,64	0,47	1,55	0,42	

¹DS: Desviación estándar.

²Valores medios con letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,050$).

Resultados

En relación con el color de la piel de las cerezas tras el periodo de vida útil (SL), se observaron fluctuaciones y diferencias entre lotes, principalmente en los puntos de muestreo 5 días de CS + 2 SL y 12 días de CS + 2 SL (**Figura VI.7**). El lote testigo mostró los valores más altos de L^* ($p \leq 0,050$) en el primer punto de muestreo ($21,78 \pm 6,46$ unidades); por el contrario, el lote MPL672 presentó el mayor brillo en el segundo punto de muestreo, mientras que el lote PK18 fue el más brillante en el punto de muestreo final ($13,67 \pm 8,78$ unidades). Se observaron diferencias en C^* en el primer y segundo puntos de muestreo de SL. Concretamente, los lotes fludioxonil ($26,15 \pm 13,81$ unidades) y PK18 ($17,11 \pm 11,22$ unidades) exhibieron el color más intenso ($p \leq 0,050$), respectivamente. El ángulo de tono Hue* fue mayor para los lotes control y PK18 a los 5 días de CS + 2 S, mientras que a los 12 días de CS + 2 SL, los lotes control y MPL672 mostraron los valores más altos, con valores superiores a 100° . Después, el ángulo de tono Hue* se situó en torno a $20-30^\circ$ para todos los lotes. El color de la pulpa a lo largo de los puntos de muestreo SL tendió a disminuir ligeramente sin diferencias entre los lotes.

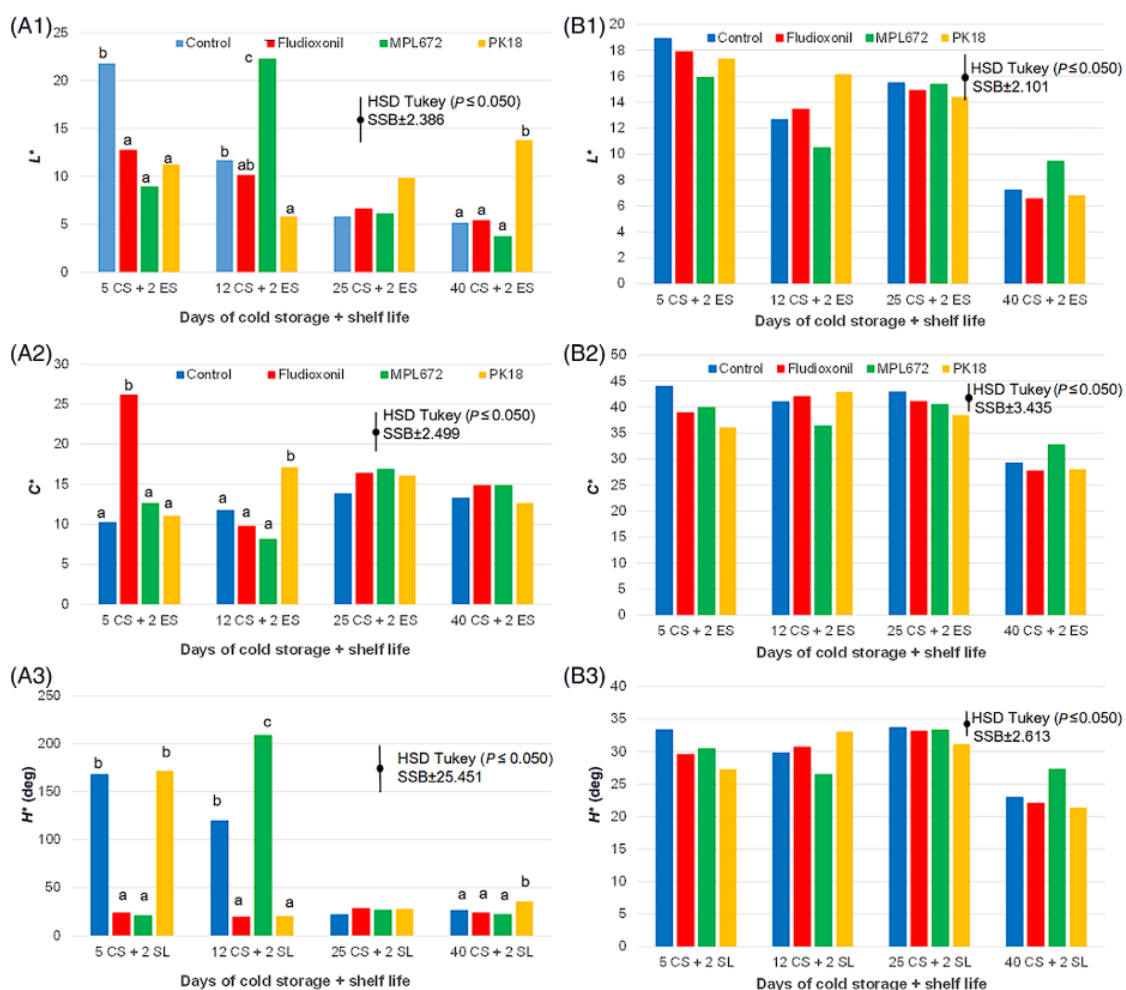


Figura VI.7. Parámetros de color (A) luminosidad L^* , (B) cromaticidad C^* , y (C) ángulo de tono h^* de (1) la piel y (2) la pulpa de cerezas "Burlat" envasadas en atmósfera modificada pasiva y tratadas con *Metschnikowia pulcherrima* L672 (MPL672; en verde), *Pichia kudriavzevii* PK18 (PK18; en amarillo), fludioxonil (en rojo), y control (en azul). Las cerezas se almacenaron a 2 °C y se colocaron 2 días a 25 °C para simular su vida útil. HSD Tukey: diferencia honestamente significativa de Tukey; SSB: barra de significación estadística.

Después de SL en los puntos de muestreo 25 días de CS + 2 SL y 40 días de CS + 2 SL, se observó una disminución de los cuatro compuestos volátiles marcadores sin diferencias significativas entre los lotes ($p \geq 0,050$), tal y como se muestra en la **Tabla V.4**.

Resultados

Tabla VI.4. Contenido de compuestos volátiles marcadores durante la vida útil de las cerezas 'Burlat' en MAP.

		Area Arbitrary Units (AAU)							
Dias	Lote	Hexanal		[E]-2-Hexenal		1-Hexanol		Benzaldehido	
		Media	DS ¹	Media	DS	Media	DS	Media	DS
0	C	617 ^{a2}	187	1631 ^{b, c}	450	605 ^a	240	847 ^c	1058
25 d (2°C) + 2 d (25°C)	C	193 ^c	82	712 ^c	540	119 ^{b, c}	70	3679 ^{b, c}	2203
	MPL672	178 ^c	207	1334 ^{b, c}	873	332 ^b	188	3284 ^c	641
	PK18	147 ^c	20	809 ^c	425	214 ^{b, c}	63	2900 ^c	1056
	Flud	69 ^c	67	234 ^c	220	78 ^{b, c}	9	832 ^c	345
40 d (2°C) + 2 (25°C)	C	34 ^c	32	125 ^c	63	52 ^c	59	839 ^c	210
	MPL672	0 ^c	0	0 ^c	0	140 ^{b, c}	70	2461 ^c	2880
	PK18	66 ^c	94	717 ^c	1133	164 ^{b, c}	127	2341 ^c	1538
	Flud	0 ^c	0	455 ^c	428	90 ^{b, c}	46	5838 ^{b, c}	7053

¹DS: Desviación estándar.

²Valores medios con letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0,050$).

VI.4 Discusión

El efecto de la atmósfera protectora en la conservación de la calidad de las cerezas está ampliamente documentado (Zoffoli *et al.*, 2017). La literatura muestra el efecto de atmósferas con bajas concentraciones de O₂ con presiones parciales de 1-3 kPa utilizando películas de polietileno (PE) (Alique *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2015), así como de altas de CO₂ que alcanzan presiones parciales de 10-45 kPa utilizando películas de polipropileno biorientado (BOPP), películas de polipropileno fundido (CPP) y películas de polietileno tereftalato-polietileno (PET-PE) (Esturk *et al.*, 2012). El MAP generado utilizando bolsas Xtend mod. 815-CH 98 mostró una rápida disminución del O₂ (5-8 kPa) y un aumento del CO₂ (~7 % kPa) a los 5 días de almacenamiento en frío, reduciendo el O₂ a ~1 kPa y aumentando el CO₂ a ~9 kPa después de 40 días. Una evolución similar fue reportada por De Paiva *et al.* (2017) utilizando películas microperforadas de polipropileno biorientado (BOPP).

Una de las principales ventajas del MAP es el control de las pérdidas de peso; y los resultados confirmaron esta afirmación con pérdidas máximas inferiores al 3%. Nuestros resultados coincidieron con Aglar *et al.* (2017) que reportaron valores en torno al 1 % de pérdida de peso tras 21 días de almacenamiento en MAP; y con Esturk *et al.* (2012) que también reportaron valores similares tras 42 días de almacenamiento en MAP. Los diferentes tratamientos aplicados en este trabajo tuvieron escaso efecto sobre la pérdida de peso; sin embargo, el análisis global mostró un mejor control de la pérdida de peso en las cerezas tratadas respecto a las cerezas control.

Trabajos previos indicaron que el MAP ralentiza el aumento de SST y pH y retrasa las reducciones de TA y firmeza durante el almacenamiento en frío; y la posterior influencia de la simulación de vida útil sobre estos parámetros (Aglar *et al.*, 2017; Diaz-Mula *et al.*, 2012). Los resultados mostrados en las **Tablas V.1** y **V.2** son consistentes con la literatura previa. No obstante, los tratamientos combinados con MAP pueden interferir en estos parámetros; así, Parka + MAP y compuestos antifúngicos naturales + MAP retrasaron los efectos de la senescencia sobre los SST, pH, TA y firmeza respecto a las MAP durante el almacenamiento en frío (Aglar *et al.*, 2017). La aplicación de microbios antagonistas no suele modificar los rasgos de calidad de la fruta (Liu *et al.*, 2010^b; Zhang *et al.*, 2008), pero el tratamiento de cerezas con PK18 y MPL672 confirió

Discusión

cambios leves pero significativos en los rasgos de calidad durante el almacenamiento en frío, de acuerdo con los cambios mostrados en uvas tras la inoculación de *H. uvarum* (Qin *et al.*, 2015) y en mango inoculado con *M. pulcherrima* (Tian *et al.*, 2018). Los efectos observados en los parámetros de calidad de las cerezas asociados a los lotes inoculados no indicaron una pérdida de calidad en comparación con las cerezas control; de hecho, algunos parámetros mostraron mejores valores, como el SST y la evolución de la firmeza en almacenamiento en frío. Por el contrario, el color de la piel mostró algunas diferencias relevantes entre lotes, principalmente al inicio del periodo de muestreo. Sin embargo, existe poca bibliografía que analice el impacto de los microorganismos antagonistas sobre los parámetros de color. En este sentido, la aplicación de *Debaryomyces nepalensis* sobre mango modificó ligeramente las coordenadas L*, a* y b* del mango tras 30 días de almacenamiento (Luo *et al.*, 2015). La interferencia en el color de la piel de la cereza por levaduras antagonistas como *M. pulcherrima* podría estar relacionada con la capacidad de modificar la síntesis de algunas enzimas endógenas como la polifenol oxidasa, la peroxidasa y, en particular, la fenilalanina amoníaco liasa (Yang *et al.*, 2021). Estas enzimas están implicadas en la síntesis y estabilidad de las antocianinas, que son los principales pigmentos que caracterizan el color de la piel de las cerezas (Serradilla *et al.*, 2016). Guo *et al.* (2021) también observaron la estimulación de la acumulación de antocianinas en naranjas sanguinas del cultivar Tarocco (*Citrus sinensis* L.) tras la aplicación de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre los compuestos volátiles de las cerezas, se seleccionaron tres compuestos marcadores: hexanal, [E]-2-hexenal y 1-hexanol, relacionados con el sabor a fruta fresca (Greger y Schieberle, 2007) y correlacionados positivamente con los sabores deseables en cereza (Serradilla *et al.*, 2010); y benzaldehído, asociado con el sabor a almendra amarga (Melgarejo *et al.*, 2014) y asociado negativamente con las preferencias de los panelistas (Serradilla *et al.*, 2010). Los tratamientos con levaduras antagonistas mostraron una evolución de los volátiles marcadores similar a la del lote fludioxonil durante CS y SL. En comparación con el lote control, se observó una disminución de los compuestos volátiles asociados al aroma de cereza fresca a los 40 días, pero, sin embargo, se observó una menor presencia de benzaldehído asociado a una menor valoración de la cereza por parte de los panelistas (Serradilla *et al.*, 2010).

La población microbiana de las cerezas durante el almacenamiento en frío está dominada por bacterias mesófilas y levaduras (Muzaffar *et al.*, 2016; Tokatlı y Demirdöven, 2020). En este sentido, la evolución de los recuentos de TAM estuvo en concordancia con los reportados por Serradilla *et al.* (2013) en el almacenamiento de cerezas cv. 'Ambrunés' bajo atmósfera controlada con 3 kPa O₂ + 10 kPa CO₂. Sus resultados mostraron que la población dominante de microbios (~ 5 log₁₀ UFC g⁻¹) correspondía a bacterias mesófilas y psicrótrofas. En nuestro caso, los recuentos de levaduras mostraron una evolución similar al TAM hasta los 12 días de almacenamiento en frío; posteriormente, se detectó un ligero descenso en los lotes control, fludioxonil y PK18 hacia el almacenamiento final. *Pichia kudriavzevii* PK18 se aisló de viñedos por lo que las bajas temperaturas y las diferencias ambientales podrían dificultar su implantación en cerezas. A pesar de esto, la morfología de las colonias y la identificación genómica confirmaron la dominancia de *P. kudriavzevii* durante todo el periodo de almacenamiento en frío en cerezas PK18; sin embargo, la disminución de los recuentos al final del almacenamiento podría estar relacionada con cambios en la atmósfera y/o en la composición de las cerezas. La población de levaduras de las cerezas no inoculadas estaba dominada por hongos tipo levadura Ascomycota como *Aureobasidium* spp. y *Cystofilobasidium* spp. de acuerdo con las identificaciones reportadas por Serradilla *et al.* (2013) y Stanevičienė *et al.* (2021). Las cerezas inoculadas con MPL672 mostraron los recuentos más altos y un establecimiento y desarrollo exitosos a lo largo del almacenamiento en frío. Trabajos previos demostraron que *M. pulcherrima* es capaz de competir y colonizar la superficie de la fruta incluso a bajas temperaturas en atmósferas con alto contenido de CO₂ (De Paiva *et al.*, 2017; Oro *et al.*, 2014).

Los ensayos de SL mostraron un aumento en los recuentos de TAM a lo largo de los puntos de muestreo, alcanzando valores máximos de 6,63±0,19 log₁₀ UFC g⁻¹, por debajo del límite de aceptabilidad de 8 log₁₀ UFC g⁻¹ para productos frescos almacenados en atmósfera modificada (Jacxsens *et al.*, 2002). Curiosamente, el fludioxonil y las inoculaciones con levaduras antagonistas redujeron el aumento de TAM en los puntos de muestreo durante el SL ($p \leq 0,001$). El aumento medio global en los recuentos de TAM para cerezas no tratadas fue de 2,03±1,47 log₁₀ UFC g⁻¹ según Serradilla *et al.* (2013); mientras que 0,56±0,59, 0,43±0,43 y 0,66±0,51 log₁₀ UFC g⁻¹ fueron el aumento medio global para los lotes de fludioxonil, PK18 y MPL672, respectivamente. Sin embargo, estas diferencias no se detectaron entre lotes al comparar los recuentos de levaduras. El

Discusión

incremento medio global en los recuentos de levaduras entre CS y SL fue de $0,37 \pm 1,20 \log_{10}$ UFC g^{-1} de cerezas no tratadas a $1,08 \pm 1,09 \log_{10}$ UFC g^{-1} de cerezas tratadas con fludioxonil.

Las atmósferas altas en CO₂ confieren un control eficaz del pardeamiento y la podredumbre fúngica en cerezas cv. 'Lapins' y cv. '0900 Ziraat', tal y como informaron Tian *et al.* (2004) y Aglar *et al.* (2017), respectivamente. Nuestros resultados mostraron una menor eficacia de los MAP en el control de la podredumbre que los estudios mencionados, con porcentajes superiores al 10 % a los 12 días de almacenamiento en frío. La diferente susceptibilidad de los cultivares a la podredumbre (Spotts *et al.*, 2002) podría explicar la razón de estos altos porcentajes. Las aplicaciones combinadas de MAP con sustancias antifúngicas o microorganismos antagonistas han mostrado un mejor control de las podredumbres desde el primer punto de muestreo a los 5 días de almacenamiento en frío, aunque sólo apareció una reducción significativa el último día de muestreo a los 40 días de almacenamiento en frío. La capacidad de *M. pulcherrima* para competir por el hierro (Saravanakumar *et al.*, 2008) e inducir respuestas de defensa del huésped (Sun *et al.*, 2021) y la producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos por *P. kudriavzevii* (Capítulo 1) puede estar implicados en el control de patógenos comunes en postcosecha de cereza como *Monilinia* spp., *C. cladosporioides*, *B. cinerea*, *P. expansum* y *P. glabrum* (De Paiva *et al.*, 2017; Oro *et al.*, 2014; Ruiz-Moyano *et al.*, 2016). La aplicación de estos tres tratamientos antifúngicos también fue eficaz en el control de la pudrición durante la vida útil (SL); principalmente en el punto final de muestreo, donde se observaron reducciones significativas ($p \leq 0,050$).

VI.5 Conclusiones

El almacenamiento de cerezas cv. Burlat en MAP (~1,5 kPa O₂, ~9 kPa CO₂) a 2°C proporciona un adecuado mantenimiento de la calidad durante 40 días de almacenamiento. La combinación de MAP con las levaduras antagonistas *M. pulcherrima* L672 y *P. kudriavzevii* PK18 aumenta el control del deterioro microbiológico con resultados comparables a la aplicación de fludioxonil. No se observaron diferencias significativas en los rasgos de calidad de las cerezas con estos tratamientos antagonistas de las levaduras. El mismo efecto de control del deterioro se observó durante la vida útil a 25 °C durante 2 días, por lo que el efecto de control de las levaduras sobre los mohos alterantes se prolonga en condiciones de mayor temperatura y atmósfera aeróbica.

CAPÍTULO 3.
CONTROL BIOLÓGICO DE MOHOS ALTERANTES EN
QUESOS DE PASTA BLANDA DE EXTREMADURA.

VII. Capítulo 3. Control biológico de mohos alterantes en quesos de pasta blanda de Extremadura.

VII.1 Resumen

El queso es uno de los alimentos más consumidos en España, en cualquiera de sus diversas presentaciones. Una de las principales causas de alteración de estos es el desarrollo de mohos. En la actualidad el uso de aditivos químicos en alimentación es cada vez más restrictivo, esto hace que sea de vital importancia encontrar métodos alternativos sostenibles. Por tanto, en este capítulo se aborda la posibilidad del uso de levaduras aisladas de quesos como agentes de biocontrol de mohos alterantes en quesos. Para ello, se evaluó y caracterizó la actividad antagonista de 84 levaduras nativas de queso frente a 3 mohos alterantes (*Penicillium commune* 1031, *Fusarium verticillioides* 1191, *Mucor plumbeus* 2367).

El cribado de la actividad antagonista, en un medio de cultivo de base láctea, evidenció que 15 levaduras presentaron una actividad destacada. La modelización del efecto los parámetros temperatura, pH y a_w mostró que la temperatura y en menor medida la a_w eran los factores que más afectaban a la actividad de las levaduras seleccionadas, observándose diferentes comportamientos a nivel de especie y cepa. La caracterización del mecanismo de acción mostró que las cepas de la especie *Kluyveromyces lactis* (KL904 y KL890) fueron las levaduras que obtuvieron mayor capacidad de reducir el crecimiento de los mohos evaluados mediante compuestos orgánicos volátiles (VOCs), asociándose esta inhibición a los VOCs feniletil alcohol y 1-butanol-3-metil propionato. En el parasitismo directo, destacó la cepa GC663 (*Geotrichum candidum* 663), la cual presentaba fuerte actividad pectinasa y β -glucanasa. La producción de enzimas líticas en el resto de las levaduras fue menor, destacando la actividad las β -glucanasa en *P. jadinii* y proteasa en *K. lactis* levaduras produjeron encimas de manera diversa. No se detectó ninguna cepa de levadura con capacidad de producir antibiosis ni biofilm. En cuanto al efecto de la competición por nutrientes, hierro y el manganeso, los resultados mostraron que este mecanismo tenía gran importancia en la actividad de las cepas de la especie *K. lactis* (KL 371, KL904, KL 874, KL 1351 y KL1098). La evaluación de la germinación confirmó los resultados de la caracterización antagonista. Ninguna de las levaduras inhibió la germinación de *P. commune* 1031, sin embargo, en los otros dos mohos, la cepa

Resumen

KL890 frente a *F. verticillioides* 1191 y PJ433 y KL890 frente a *M. plumbeus* 2367 mostraron actividad. Por último, en la evaluación *in vivo*, igualmente ninguna levadura fue capaz de controlar el crecimiento de *P. commune* 1031, en cambio, frente a *F. verticillioides* 1191 y a *M. plumbeus* 2367, notablemente las cepas KL1507 y GC663 y PJ433, respectivamente, presentaron actividad. En conclusión, las levaduras *G. candidum* GC663 y *P. jadinii* PJ433 mostraron destacada actividad antifúngica frente a mohos alterantes en queso *in vitro* e *in vivo*, pudiendo ser consideradas potenciales agentes de biocontrol alternativos a los aditivos químicos. Sin embargo, una mejor comprensión de sus mecanismos de acción y estudios en quesos, serían necesarios para confirmar su aplicabilidad.

VII.2 Material biológico y diseño experimental

Las levaduras forman parte de la microbiota secundaria de los quesos de leche cruda y contribuyen a los procesos bioquímicos que definen sus características sensoriales finales (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019; Merchán *et al.*, 2022). En este tipo de quesos uno de los principales causantes de alteración es el desarrollo de mohos en las partes externas (Kure y Skaar, 2019). En la actualidad, el control de mohos en las queserías se realiza con antifúngicos químicos, sin embargo, los consumidores demandan productos cada vez más naturales, así como la legislación europea, a través del pacto verde, tiene como objetivo reducir su aplicación. En este contexto, la búsqueda de alternativas naturales para el control de las alteraciones fúngicas en los alimentos es una prioridad en la comunidad científica. Una de estas alternativas podría ser la utilización de agentes antagonistas frente a mohos como pueden ser las levaduras. Por tanto, es importante caracterizar la naturaleza antifúngica que puedan tener levaduras autóctonas de quesos de leche cruda de pasta blanda para su potencial uso como antifúngicos. Para ello es necesario primero hacer un aislamiento de levaduras y mohos. En la **Figura VII.1** se muestra gráficamente el diseño experimental de este capítulo.

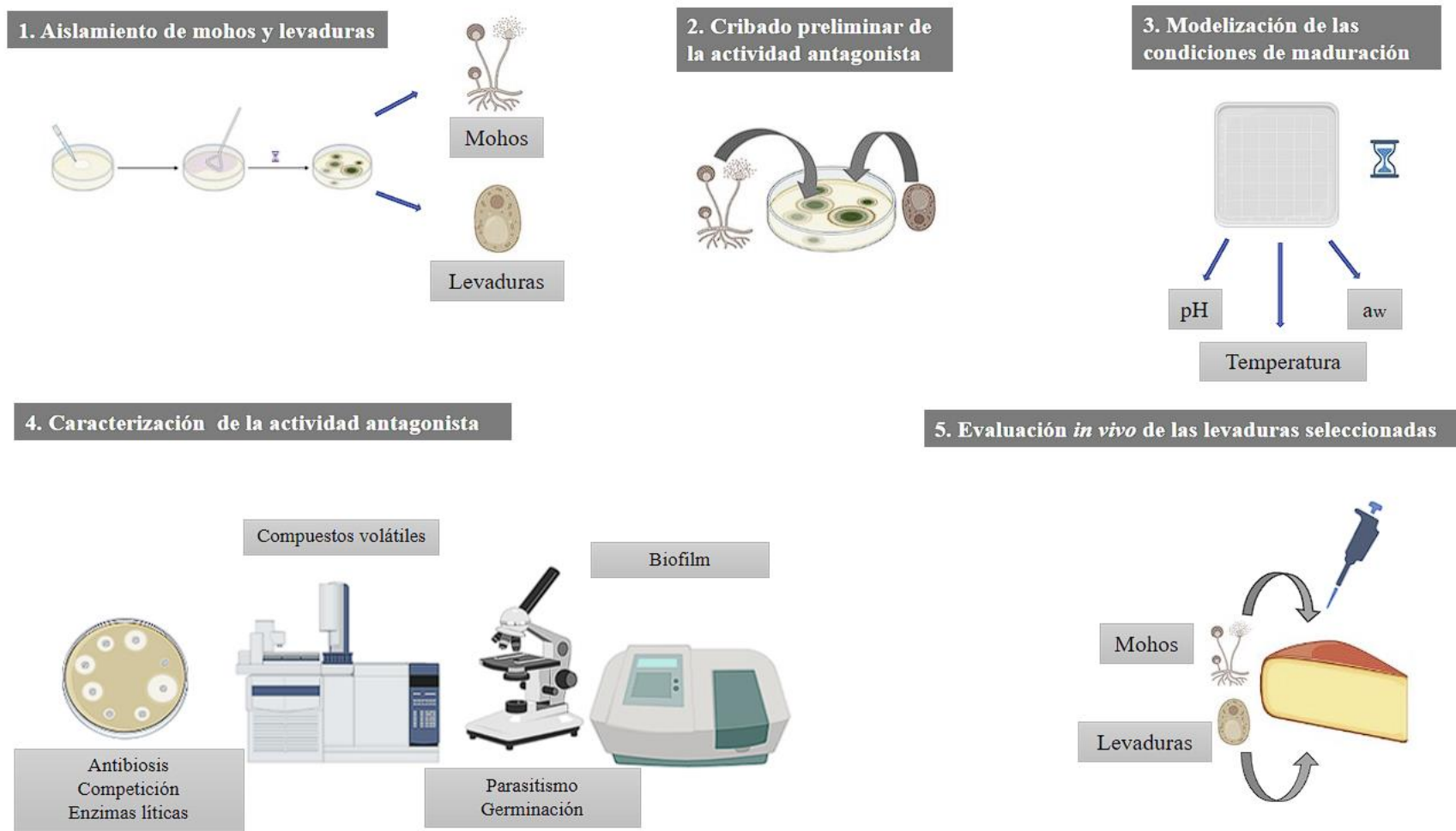


Figura VII.1. Esquema general que se siguió durante el desarrollo de este capítulo (Elaboración propia).

Una vez realizado el aislamiento de levaduras y mohos, se realizó una confrontación directa de las levaduras y los mohos. En base a los resultados de este enfrentamiento se seleccionaron las levaduras con mayor potencial antagonista, además de otras sin actividad para usarlas como controles negativos. Posteriormente a esta primera selección, se realizó una confrontación con diferentes condiciones de pH, temperatura y a_w , simulando así las condiciones de maduración de los quesos de pasta blanda, para evaluar su impacto en la actividad antagonista. Finalmente, aquellas levaduras que mostraron una mejor actividad a las condiciones de maduración de los quesos de pasta blanda fueron seleccionadas para la caracterización de los posibles mecanismos de acción de las mismas; producción de compuestos volátiles, inhibición de la germinación, parasitismo, antibiosis, enzimas líticas, producción de biofilm y competición -por nutrientes.

VII.2.1 Aislamiento de mohos y levaduras

Un total de 84 levaduras y cuatro mohos alterantes fueron utilizados en este estudio (**Tabla VII.1**). Las levaduras fueron aisladas de queso de pasta blanda de oveja y fueron identificadas a nivel de cepa por Merchán *et al.* (2022). Para obtener los mohos alterantes, se tomaron muestras de corteza de queso en las que visualmente habían crecido mohos durante su periodo de maduración a los 0, 20, 40 y 60 días de 6 queserías diferentes (3 queserías pertenecientes a la DOP Queso de la Serena y las otras 3 a la DOP Torta del Casar). Las muestras se diluyeron 10 veces con agua de peptona al 1% (Condalab, Madrid, España) y se homogeneizaron durante 120 segundos en un Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, Londres, UK). Los homogeneizados se diluyeron en serie y las alícuotas de cada dilución se inocularon en placas de agar dextrosa de patata acidificado (PDA; Condalab) con una solución esterilizada al 1% (v/v) de ácido tartárico al 10% (p/v). Las placas de PDA se incubaron a 25 °C durante 5 días. El aislamiento de los mohos se realizó basándose en la morfología de las colonias. Se seleccionaron dos colonias de cada morfología y muestra a partir de las diluciones más altas. Cada aislado se subcultivo en PDA hasta tener una colonia pura. Después los aislados se almacenaron en glicerol estéril al 25% (v/v) a -80°C.

Material biológico y diseño experimental

Tabla VII.1. Levaduras aisladas usadas para el presente trabajo, indicando el código y su identificación (Merchán *et al.*, 2022).

Género	Especie	Numero de aislados seleccionados	Código de cepa
<i>Candida</i>	<i>C. zeylanoides</i>	9	17, 350, 665, 882, 896, 921, 925, 1214, 1459
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>	16	329, 330, 353, 898, 910, 923, 933, 954, 1088, 1092, 1100, 1206, 1232, 1238, 1249, 1251
<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>	5	369, 663, 902, 1006, 1461
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i>	7	371, 874, 890, 904, 1098, 1351, 1507
	<i>K. marxianus</i>	2	364, 1070
<i>Pichia</i>	<i>P. fermentans</i>	4	170, 1076, 1364, 1438
	<i>P. jadinii</i>	5	173, 433, 659, 1008, 1468
	<i>P. kudriavzevii</i>	16	2, 165, 373, 435, 645, 871, 939, 1074, 1094, 1193, 1224, 1241, 1360, 1368, 1436, 1509
	<i>P. sporocuriosa</i>	1	1443
<i>Yarrowia</i>	<i>Y. alimentaria</i>	4	929, 1204, 1221, 1476,
	<i>Y. lipolytica</i>	15	387, 498, 502, 510, 522, 667, 888, 912, 918, 947, 996, 1090, 1160, 1202, 1362
Total: 6	Total: 11	Total: 84	

Para identificar lo mohos a nivel de especie, se extrajo el ADN genómico de los aislados de moho utilizando el kit NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los marcadores genéticos, ITS, β -tubulina y subunidad ribosomal grande 26S, se amplificaron utilizando las parejas de cebadores ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), Bt2a/Bt2b (Glass y Donaldsson, 1995) y NL1/NL4 (O'Donnell, 1993), respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con las concentraciones de reactivos descritas en el capítulo 1 apartado V.2.3. Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR GeneJET (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se secuenciaron en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España). Las secuencias se editaron utilizando Bioedit versión 7.2 y se comprobaron mediante comparación nucleótido-nucleótido BLAST en la base de datos NCBI. Las identidades de los aislados se determinaron en función de la puntuación más alta.

VII.2.2 Cribado de la actividad antagonista de las levaduras aisladas

VII.2.2.1 Cultivo de microorganismos y preparación de inóculos

Para el cultivo de los microorganismos y la preparación de los inóculos se siguió el procedimiento descrito en el capítulo 1, apartado V.2.4.1.

VII.2.2.2 Cribado de la actividad antagonista

Se utilizaron tres mohos como causantes del deterioro en queso para examinar la actividad antagonista de las levaduras seleccionadas. Estos mohos fueron *Mucor plumbeus* 2367, *Penicillium commune* 1031 y *Fusarium verticillioides* 1191. La capacidad antagonista de las cepas de levadura contra los tres mohos objetivos se realizó mediante un ensayo de confrontación directa entre las levaduras y los mohos alterantes. Para el ensayo se utilizaron PDA y agar leche desnatada (SM, Pronadisa, Barcelona, España) ajustados a diferentes condiciones de pH, NaCl y a_w . El medio SM se preparó disolviendo leche desnatada en polvo (10 g/L; PanReac AppliChem, Barcelona, España) y agar bacteriológico (15 g/L; Condalab) en agua destilada, se esterilizó en autoclave durante 5 minutos a 115°C y se vertió en placas de Petri. Para ajustar el pH del medio a 4,5 y 5,5, después de esterilizarlos en autoclave se añadió de forma aséptica una solución esterilizada de ácido láctico al 10% (p/v) hasta alcanzar el pH deseado en el medio. A continuación, para analizar la influencia del NaCl en la actividad antagonista, se utilizaron los medios ajustados a pH 5,5 y suplementados o no con diversas concentraciones de NaCl (1,5 y 3%). Por último, se evaluó la influencia de la a_w en medios a pH 5,5, 3% de NaCl y a_w variable (0,97, 0,95 y 0,92). Para evaluar la capacidad antagonista de las levaduras, se añadieron 100 μ L sembrados en superficie de una solución de conidios (10^5 conidios/mL) de cada moho objetivo al agar y se extendieron. Tras el secado, se inocularon 5 μ L de cada suspensión de levadura (10^7 células/mL) en placas de agar en posiciones equidistantes. Como controles negativos, se realizó la misma operación, pero se adicionaron 5 μ L de agua destilada en lugar de la suspensión de levaduras. Las placas se dejaron incubando durante 5 días a 25°C. Las modificaciones en el crecimiento de los mohos diana en las placas de levadura se compararon con las placas control. Las confrontaciones se realizaron por triplicado. Se seleccionaron los aislados de levadura que indujeron las mayores modificaciones en el crecimiento micelial para caracterizar su capacidad antagonista.

VII.2.3 Modelización del impacto de las condiciones de maduración del queso en la actividad antifúngica mediante secreción de sustancias

Para realizar esta modelización, se aplicó un diseño experimental Box-Behnken (BBD) con tres factores, temperatura, actividad de agua (a_w) y pH, para así investigar como afectaban estos factores de forma conjunta a la actividad antifúngica. Los valores se establecieron como muestra la **Tabla VII.2**, para así englobar las condiciones del proceso de maduración de los quesos de pasta blanda "Torta del Casar" y "Queso de la Serena" (Martínez *et al.*, 2011). Para el ensayo se utilizó medio de agar leche desnatada al 5% (p/v). Este medio fue suplementado con tres concentraciones diferentes de NaCl (**Tabla VII.2**). Además, el pH de los medios fue ajustado a las 3 condiciones diferentes, con una solución de ácido láctico al 10% (p/v). Para evaluar la capacidad antagonista de las levaduras, se añadieron 100 μL de una solución de conidios (10^5 conidios/mL) de cada moho objetivo en superficie y se extendieron. Tras el secado, se inocularon 5 μL de cada suspensión de levadura (10^7 células/mL) en las placas de agar en posiciones equidistantes. Una vez inoculados los medios, se dejaron incubar a sus temperaturas correspondientes (**Tabla VII.2**) durante 7 días. Una vez crecido el moho, se anotaron los radios de los halos que se habían formado, así como las diferentes actividades detectadas.

Tabla VII.2. Condiciones empleadas en la modelización del impacto de las condiciones ambientales sobre la actividad antifúngica de las levaduras.

Temperatura	pH	a _w
20°C	4,5	0,905
	5	0,97
		0,84
5,5	0,905	
14°C	4,5	0,97
		0,84
	5	0,905
	5,5	0,97
		0,84
8°C	4,5	0,905
	5	0,97
		0,84
	5,5	0,905

VII.2.4 Caracterización de la actividad antagonista

VII.2.4.1 Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

La producción de VOCs antifúngicos por levaduras seleccionadas se llevó a cabo mediante un sistema de doble placa (DDS) tal y como describieron por Ruiz-Moyano *et al.* (2020) con modificaciones. Brevemente, se inocularon 5 µL de suspensión de conidios (10^5 conidios/mL) del moho en el punto central del agar PDA acidificado y se colocó en DDS. Después de eso, 100 µL de suspensión de levadura (10^7 células/mL) se extendieron sobre agar SM a pH 5,5 y se colocaron en la parte superior de DDS. Las placas de agar fueron confrontadas y selladas con parafilm™, descartándose las partes superiores. Posteriormente, se realizaron 4 perforaciones (3 mm × 5 mm) en la unión de ambas placas. Se utilizó como control agar SM a pH 5,5 sin inoculación de levadura, pero con PDA acidificado inoculado con el moho diana. Los DDS se incubaron a 25 °C durante 7 días. El experimento se realizó por triplicado y el diámetro de los micelios de cada réplica se midió diariamente en dos direcciones en ángulo recto entre sí. Además, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del moho objetivo se calculó según muestra la **Ecuación VII.1:**

$$\text{Inhibición (\%)} = (\text{DC} - \text{DT}) / (\text{DC}) \times 100$$

(Ec. VII.1)

donde DC es el diámetro del micelio en control (mm), y DT es el diámetro del micelio del moho objetivo confrontado con levadura en DDS.

El análisis e identificación de los compuestos volátiles producidos por levaduras que mostraron inhibición de moho en DDS y tres levaduras sin actividad se determinaron a los 3 y 7 días después de la confrontación por DDS mediante cromatografía/espectrometría de masas como describieron Ruiz-Moyano *et al.* (2020). El análisis se realizó en un sistema Agilent 6890 GC-5973 MS (Agilent Technologies, Little Falls, DE, EUA) equipado con una columna de polidimetilsiloxano al 5% fenil-95% (30 m × 0,32 mm de diámetro interior, 1,05 μm de espesor de película, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA). Para detectar los posibles VOCs antifúngicos, los compuestos volátiles producidos por levaduras sin actividad y control se restaron del perfil volátil de levaduras con capacidad antifúngica.

VII.2.4.2 Efecto en la germinación de los conidios de los mohos alterantes

El efecto de las levaduras en la germinación de los conidios fue realizado en medio de leche desnatada (SM), siguiendo el procedimiento conforme se detalla en el capítulo 1, apartado 1.5.2. Para este ensayo se realizó una siembra en masa para las levaduras seleccionadas con una concentración de 10⁷ células/mL. Una vez hubo solidificado el medio se realizó una siembra en césped de los diferentes mohos con una concentración 10⁵ conidios/mL. Como control se realizó el mismo ensayo inoculando 100 μL de agua estéril en lugar de la suspensión de levaduras. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 10 h. Después de la incubación se evaluó en 100 conidios por muestra el tamaño del tubo germinativo mediante la observación con 20X aumentos en un microscopio LED Leica DM 2000 (DMLS, Leica, Buccinasco, MI, Italia). Un conidio se considera germinado cuando la longitud del tubo germinal excede el diámetro del conidio. El porcentaje de reducción de la germinación de esporas se calculó comparando el número de esporas germinadas en las placas confrontadas con levadura y mohos con respecto a la germinación en los controles. El experimento se realizó en triplicado por cada aislado de levadura.

VII.2.4.3 Parasitismo directo

La interacción parasitaria entre levaduras seleccionadas y mohos objetivos se evaluó en agar SM a 2.5% (p/v) de leche descremada en polvo (8 mL por placa) siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 1 apartado VI.2.5.3. Este ensayo se realizó por duplicado, realizándose tres repeticiones técnicas cada vez.

VII.2.4.4 Producción de sustancias antifúngicas extracelulares: antibiosis y enzimas líticas

Antibiosis

La capacidad de producir sustancias extracelulares antifúngica por parte de las levaduras seleccionadas por su habilidad de producir un halo de inhibición se evaluó en caldo SM ajustado a pH 5,5. Este medio se realizó al 5 % (p/v) de leche desnatada.

Para este bioensayo se cultivaron en caldo SM individualmente las levaduras seleccionadas junto con *M. plumbeus* 2367 durante 72 horas a 25°C y 150 rpm de agitación. Como control negativo del ensayo se cultivaron las levaduras de forma individual sin presencia del moho diana y el moho diana sin presencia de levaduras. A las 48 horas y 72 horas de incubación se tomaron muestras del medio. Se utilizaron tres condiciones diferentes. En primer lugar, se realizó un enfrentamiento de las levaduras seleccionadas contra el moho objetivo y aparte se hicieron controles negativos, dejando crecer los microorganismos sin confrontación. Una vez se recogieron las muestras de las diferentes condiciones se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 g, se recogió el sobrenadante y se filtró por filtros de nylon de 0,45 µm. Posteriormente se dejó en congelación a -80°C para su posterior uso.

Una vez descongeladas, el sobrenadante filtrado se mezcló al 50% (v/v) con agar SM 2X a 50°C, se vertió en placas de 55 mm y se dejó solidificar. Posteriormente se realizó una inoculación en el centro de todas las placas con *M. plumbeus* 2367, añadiéndose 3 µL con una concentración de conidios de 5×10^4 conidios/mL. Se realizaron mediciones diametrales diariamente del crecimiento del moho. Este ensayo se realizó por duplicado, realizándose tres repeticiones técnicas cada vez.

Producción de enzimas líticas

Se determinaron la actividad de cuatro enzimas líticas (pectinasa, β -glucanasa, quitinasa y proteasa) para comprobar la degradación de la pared celular. Se realizó tal y como se describe en el capítulo 1 apartado VI.2.5.5. La capacidad de producir proteasas extracelulares se determinó en agar SM al 5% de leche desnatada a dos temperaturas diferentes a 15 y a 25°C, respectivamente. Se midieron las zonas claras formadas alrededor de las levaduras a los 6 días de incubación. Este ensayo se realizó por triplicado.

VII.2.4.5 Producción de biofilm

La capacidad de formar biofilm *in vitro* en las levaduras seleccionadas se determinó según el procedimiento detallado en el capítulo 1 apartado VI.2.5.6. Se utilizó además una cepa como control positivo, la cepa *K. marxianus* 2459, que previamente se había utilizado en diferentes ensayos por el grupo CAMIALI. La determinación se realiza por triplicado.

VII.2.4.6 Efecto de la concentración de hierro y manganeso sobre la actividad antagonista

La influencia de la concentración de hierro en las levaduras productoras del halo inhibitorio se llevó a cabo como se describe Cordero-Bueso *et al.* (2017). El ensayo se realizó por triplicado en cuatro medios diferentes, agar YPD (Condalab), agar nutriente (Condalab), agar de malta de levadura (YMC; extracto de levadura, 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L, glucosa 10 g/L y agar 15 g/L; Condalab) y SM a pH 5,5. Los medios de cultivo se suplementaron con 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de FeCl_3 . De la misma manera que con el hierro se realizó con manganeso, para lo cual se utilizaron concentraciones diferentes (0, 0,1, 1, 6 y 10 mg/L). Se inocularon 100 μL de suspensión de conidios (10^5 conidios/ml) del mohó objetivo (*M. plumbeus* 2367) y se extendieron en placas. Después del secado, se añadieron 5 μL de soluciones de células de levadura (10^7 células/mL) en placas de agar. Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días. A continuación, se midió el tamaño de los halos de inhibición y se evaluó el papel de la competencia por el hierro en la actividad antagónica de las levaduras. Este ensayo se realizó por cuadruplicado.

VII.2.5 Evaluación *in vivo* de las levaduras seleccionadas

Se realizó un estudio de la eficiencia de las levaduras seleccionadas en cuñas de queso tierno cortadas de la casa comercial “Entrepinares” adquiridos en supermercados de la cadena Mercadona. En primer lugar, en las cuñas de queso se realizó una pequeña incisión utilizando una punta de pipeta de aproximadamente 3 mm de profundidad \times 3 mm de diámetro. En ese orificio se inocularon 5 μ L de la solución de conidios de *P. commune* 1031, *M. plumbeus* 2267 y *F. verticillioides* 1191 a una concentración de 10^5 conidios/mL. En la misma incisión se añadieron 5 μ L de un inóculo de las levaduras seleccionadas en una concentración de 10^7 células/mL. Además, se realizaron 3 controles, uno negativo, donde solo se inoculó el moho sin confrontación con ningún tipo de microorganismo, y por otro lado un control positivo con natamicina. En el control positivo se utilizó una solución de 1000 ppm, de la cual se añadió 5 μ L junto con la cantidad correspondiente del moho objetivo. Posteriormente, las cuñas de queso se almacenaron en placas de Petri sin medio de cultivo y estériles. Se dejaron incubar a 25°C durante 12 días, midiendo diariamente el diámetro de los mohos. Este ensayo se realizó por triplicado.

VII.2.6 Tratamiento de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos del porcentaje de inhibición de los mohos dianas mediante VOCs, producción de biofilm, inhibición de la germinación de esporas e inhibición del moho diana en cuñas de queso se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías utilizando el programa SPSS para Windows, 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Cuando el efecto de la interacción es significativo ($p \leq 0,050$) se procedió a la realización de un análisis de comparación de medias por el método Tukey que determina la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta sea estadísticamente significativa.

Para la modelización del impacto de las condiciones de maduración en la actividad antagonista se aplicó un diseño Box-Behnken de 3 niveles y 3 factores con 15 ejecuciones experimentales por bloque (12 en puntos factoriales y 3 en el centro) combinado con el método de respuesta de superficie para determinar los efectos de las condiciones de maduración (pH, temperatura y a_w) sobre la actividad antifúngica de las levaduras frente

Material biológico y diseño experimental

al moho diana. La metodología de respuesta superficial se realizó empleando el software StatGraphics Centurion XVI versión 8.0. El modelo cuadrático fue el siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

donde Y es la variable de respuesta (halo de inhibición) predicha por el modelo; β_0 es un valor de desfase; β_1 , β_2 y β_3 son los coeficientes de regresión para los términos principales (lineales); β_{11} , β_{22} y β_{33} son efectos cuadráticos; β_{12} , β_{13} y β_{23} son efectos de interacción; y X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes. El modelo se utilizó para estimar el halo de inhibición de las levaduras aisladas frente a mohos en las condiciones de maduración de los quesos Torta del Casar y Queso de la Serena DOP. El software también generó un ANOVA, estableciendo la significación estadística al nivel de confianza del 95%. También se obtuvieron con el mismo programa estadístico los niveles óptimos de inhibición de cada variable analizada.

Además, el cribado de la actividad antifúngica y efecto de la competición por nutrientes en la actividad antagonista por halo de inhibición fue analizado mediante un análisis de agrupamiento mediante el método de clustering 'ward.D2' y la visualización de los mismos por mapas de calor utilizando el paquete R 'pheatmap' versión 1.0.12 (Kolde, 2019). Finalmente, la relación entre los VOCs producidos por las levaduras seleccionadas y la actividad antifúngica por esta actividad fue establecida mediante correlación de Pearson y análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa SPSS software para Windows 21.0 (IBM Corp.).

VII.3 Resultados

VII.3.1 Aislamiento de mohos y levaduras

En este estudio se caracterizó la actividad antifúngica de 84 cepas de levadura pertenecientes a un total de 11 especies (Merchán *et al.*, 2022; **Tabla VII.1**). Para ello se realizaron aislamientos de mohos de quesos tradicionales de leche cruda de oveja de pasta blanda. En total se obtuvieron un total de 25 aislados. Los aislados fueron asociados a tres especies, 8 aislados pertenecían *Mucor plumbeus*, 12 aislados a *Penicillium commune* y 5 aislados pertenecían a la especie *Fusarium verticillioides*, de los cuales se seleccionó uno de cada especie para el estudio (**Tabla VII.3**).

Tabla VII.3. Mohos aislados usados en el presente trabajo, indicando el código y la identificación.

Código	Identificación
1031	<i>Penicillium commune</i>
1191	<i>Fusarium verticillioides</i>
2367	<i>Mucor plumbeus</i>

VII.3.2 Cribado de la actividad antagonista

En esta primera confrontación, se enfrentaron las 84 levaduras aisladas contra los 3 mohos seleccionados. En este enfrentamiento se tuvo en cuenta diversos factores de forma independiente como la concentración de NaCl (1,5 y 3%), el pH (4,5, 5 y 5,5) y la a_w (0,97, 0,95 y 0,92). Tras la incubación a 25°C, se hicieron anotaciones de las diferentes actividades que mostraron las diferentes levaduras frente a los mohos. Estas actividades se pueden resumir en tres. Por un lado, se obtuvo la actividad de Halo (H), asociada a la liberación de sustancias al medio que inhibieron parcial o totalmente el crecimiento del moho alrededor de ellas. Por otro lado, hubo otras actividades (OA) en las que se agrupan el cambio de morfología, donde la levadura provoca un cambio en el color o en la forma de crecimiento del moho, y la competición por el espacio, que es aquel comportamiento en el que el crecimiento de los microorganismos implicados delimita el crecimiento del otro. Por último, también hubo levaduras que no mostraron ningún tipo de actividad apreciable frente al moho (SA).

En la **Figura VII.2** se muestra un mapa de calor donde se representan los diferentes tipos de actividad (verde oscuro para el halo, naranja para otras actividades y

Resultados

azul para las levaduras que no mostraron actividad), las diferentes condiciones ensayadas (marrón para la actividad de agua, color beige para la concentración de NaCl y en azul celeste se muestran los resultados de pH) y los 3 mohos utilizados (en rosa *F. verticillioides* 1191, en marrón *M. plumbeus* 2367 y en verde *P. commune* 1031). El análisis de agrupamiento muestra que las levaduras se agrupan en dos grandes clústeres; por un lado, tenemos una agrupación de las especies que no han presentado o han presentado baja actividad frente a los mohos investigados y, por otro lado, tenemos otro clúster donde las levaduras han presentado actividad de mayor intensidad. En el primer grupo se situaron algunas cepas que presentaron cierta actividad, como es el ejemplo de *Pichia sporocuriosa*, que produjo un halo frente a *M. plumbeus* 2367 en determinadas actividades de agua. De la misma manera, se observa como algunas cepas de *Pichia fermentans* presentaron halo frente a este mismo moho, en determinadas condiciones de a_w y concentración de NaCl. En este mismo clúster, se observa como hubo cepas de levaduras que mostraron actividad (OA) frente a *F. verticillioides* 1191 por ejemplo, *Yarrowia alimentaria* y algunas cepas de *Candida zeylanoides*. El otro gran clúster, como se ha resaltado anteriormente, comprende las especies que han mostrado una mayor actividad de formación de halo frente a los mohos. En este agrupamiento destacan 4 especies que son *Pichia jadinii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus*. Estas levaduras mostraron mayor actividad frente a *M. plumbeus* 2367 y *F. verticillioides* 1191, independiente del tipo de condición ensayada. Las cepas de la especie *G. candidum* presentaron la capacidad de formar halo, aunque su acción principal se engloba dentro de otras actividades, mediante la competición por el espacio. En cuanto a otras cepas, como las cepas de las especies *K. lactis* y *K. marxianus*, éstas presentaron un comportamiento similar, mostrando gran capacidad de formar halo frente a *M. plumbeus* 2367 y *F. verticillioides*, aunque también presentaron otras actividades. Por último, las cepas pertenecientes a la especie *P. jadinii* se caracterizaron por controlar el crecimiento de los mohos *M. plumbeus* 2367 y *F. verticillioides* mediante la formación de halos, aunque como se observa en la **Figura VII.2** no presentaron otras actividades. En general, la actividad de las levaduras ensayadas fue nula o muy limitada frente a *P. commune* 1031.

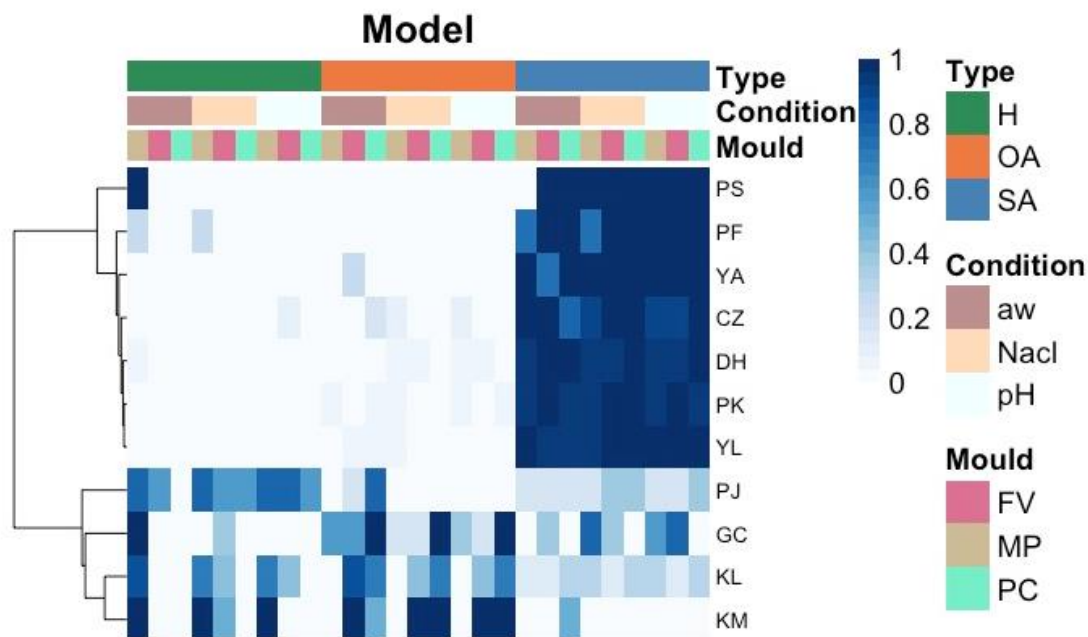


Figura VII.2. Mapa de calor de las diferentes especies de levaduras respecto a las diferentes actividades antagonistas en los ensayos de confrontación directa. Los datos utilizados en el mapa térmico son la abundancia relativa de los diferentes tipos de actividades. Tanto en las columnas como en las filas se agrupan utilizando la distancia euclidiana y el enlace medio. La escala de varianza unitaria se aplica a las filas. La escala de colores representa la escala de abundancia relativa de cada cepa (PS, *Pichia sporocuriosa*; PF, *Pichia fermentans*; YA, *Yarrowia alimentaria*; CZ, *Candida zeylanoides*; DH, *Debaryomyces hansenii*; PK, *Pichia kudriavzevii*; YL, *Yarrowia lipolytica*; PJ, *Pichia jadinii*; GC, *Geotrichum candidum*; KL, *Kluyveromyces lactis*; KM, *Kluyveromyces marxianus*) que mostro esa actividad en todos los ensayos, con el color azul oscuro indicando una abundancia alta y con blanco, nula abundancia.

En base a estos resultados, se seleccionaron las cepas de levadura que mayor capacidad de formación de halo presentaron, como fueron PJ 173 (*P. jadinii* 173), KM 364 (*K. marxianus* 364), KL 371 (*K. lactis* 371), PJ 433 (*P. jadinii* 433), PJ 659 (*P. jadinii* 659), GC663 (*G. candidum* 663); KL 874 (*K. lactis* 874), KL890 (*K. lactis* 890), KL904 (*K. lactis* 904), PJ 1008 (*P. jadinii* 1008), KM 1070 (*K. marxianus* 1070), KL1098 (*K. lactis* 1098), KL 1351 (*K. lactis* 1351), PJ 1468 (*P. jadinii* 1468) y KL 1507 (*K. lactis* 1507).

VII.3.3 Modelización del impacto de las condiciones de maduración del queso en la actividad antifúngica mediante la secreción de sustancias antifúngicas

Una vez seleccionadas las levaduras con actividad antifúngica relevante, con el objetivo de evaluar el impacto de los principales factores asociados en la maduración del queso en su conjunto sobre esta actividad se realizó un diseño experimental Box-Behnken (BBD) con los tres factores temperatura, a_w y pH. En la **Tabla VII.4**, se muestran los valores medios, desviación típica, máximo y mínimo de los radios de los halos de inhibición originados por las levaduras seleccionadas al crecimiento de los mohos *M. plumbeus* 2367 y *F. verticillioides* 1191. En el caso de *P. commune* 1031, ninguna de las levaduras mostró actividad frente a él.

Tabla VII.4. Estadísticos descriptivos de los radios de halos de inhibición originados por las levaduras seleccionadas con capacidad antagonista en el conjunto de condiciones ensayadas en el modelo experimental.

	<i>F. verticillioides</i> 1191				<i>M. plumbeus</i> 2367			
	Media	DS	Mínimo	Máximo	Media	DS	Mínimo	Máximo
PJ173¹	2,53 ± 1,51		0	4	3,23 ± 1,70		0	5,5
KM364	0,67 ± 0,62		0	2	0,83 ± 0,79		0	2
KL371	1,80 ± 0,68		0	3	2,00 ± 0,76		1	3
PJ433	2,87 ± 1,06		1	4	3,00 ± 1,68		0	5
PJ659	2,20 ± 1,21		0	4	3,00 ± 1,77		0	5
KL874	1,73 ± 0,70		1	3	1,73 ± 0,50		1	2,5
KL890	1,80 ± 0,68		0	3	2,17 ± 0,59		1	3
KL904	1,60 ± 1,18		0	3	1,87 ± 0,67		0	3
PJ1008	2,20 ± 1,15		0	4	3,40 ± 1,68		0	5
KM1070	0,93 ± 0,96		0	3	0,97 ± 1,37		0	5
KL1098	1,80 ± 0,56		1	3	2,57 ± 0,62		2	4
KL1351	1,33 ± 0,90		0	3	2,43 ± 0,56		1,5	3
PJ1468	1,60 ± 1,06		0	4	2,20 ± 1,47		0	4
KL1507	1,67 ± 0,90		0	3	1,67 ± 0,98		0	3

¹ Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, PJ (*Pichia jadinii*), KM (*Kluyveromyces marxianus*) y KL (*Kluyveromyces lactis*), el número pertenece al código de cepa.

En términos generales, las cepas PJ173, PJ433, PJ659 y PJ1008, todas ellas pertenecientes a la especie *P. jadinii*, mostraron los mayores halos de inhibición frente a *F. verticillioides* 1191 y *M. plumbeus* 2367, con valores medios superiores o iguales a 2 y 3 mm respectivamente (**Tabla VII.4**). Igualmente, estas cepas registraron los valores más altos para los máximos frente a *F. verticillioides* 1191 (2 mm) y *M. plumbeus* 2367

(5-5,5 mm). Cabe destacar la actividad de la cepa PJ173 frente a *M. plumbeus* 2367 con un valor medio y máximo de 3,23 y 5,5 mm, respectivamente. Las cepas del género *Kluyveromyces* (*K. lactis* y *K. marxianus*), produjeron unos halos menores, entre 1 y 2 mm de radio aproximadamente.

En la **tabla VII.5** se puede observar como la actividad antifúngica frente a *F. verticillioides* 1191 de 7 (4 *P. jadinii* y 3 *Kluyveromyces*) de las 14 cepas de levaduras testadas se ajusta bien a los factores y los rangos del modelo diseñado (R^2 ajustado > 50). En el caso de las cepas de *P. jadinii*, la temperatura fue el factor de mayor peso en el modelo con un ajuste lineal (A) y cuadrático (AA) significativo ($p \leq 0,050$) para las 4 cepas. En concreto, el modelo de la actividad antifúngica de cepa PJ173 presentó un valor de 95,59 para R^2 ajustado, con óptimo (máximo) de inhibición frente a *F. verticillioides* 1191 de 4,4 mm a 16,6 °C, a_w de 0,87 y pH de 5. Valores similares a estos fueron estimados para el resto de las cepas de *P. jadinii*. En el caso de las cepas pertenecientes al género *Kluyveromyces*, la diferencia más relevante en cuanto a los valores óptimos de inhibición fue la temperatura (entre 8 y 8,4 °C) con mayor peso en los modelos de los factores a_w y pH, así como sus interacciones. Para el caso de la cepa KM1070, se ha estimado (R^2 ajustada de 62,11) un halo de inhibición de 3,92 mm a una temperatura de 8,4 °C, a_w de 0,84 y un pH de 4,5.

En relación con el impacto de los factores en la capacidad de inhibición del crecimiento de *M. plumbeus* 2367, la actividad de 8 cepas (5 pertenecientes a *P. jadinii* y 3 al género *Kluyveromyces*) de las 14 cepas estudiadas se ajustó adecuadamente al modelo (R^2 ajustada > 50; **Tabla VII.6**). De nuevo, la temperatura fue el factor con mayor impacto junto, en este caso, la a_w . Para las cepas de *P. jadinii*, las condiciones óptimas de inhibición para la cepa PJ433 (R^2 ajustada de 93) fueron 17,3 °C, 0,97 de a_w y un pH de 5,5 con un valor estimado de 5,56 mm, si bien fue la cepa PJ173 la que presentó un valor estimado de inhibición mayor (5,87 mm) a unas condiciones de temperatura y pH algo inferiores (15,5 °C a pH de 4,5). En el caso de las cepas del género *Kluyveromyces*, la actividad de la cepa KL371 fue la que mejor se ajustó al modelo (R^2 ajustada de 91,25) con un valor estimado de 3,38 mm a 10,5 °C, a_w de 0,84 y un pH de 4,5.

Resultados

Tabla VII.5. Resultados ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta y condiciones óptimas en las que cada levadura obtendría un mejor control del crecimiento de *Fusarium verticillioides* 1191.

	PJ173 ¹	KM364	KL371	PJ433	PJ659	KL874	KL890	KL904	PJ1008	KM1070	KL1098	KL1351	PJ1468	KL1507
A: Temperatura	0,000**	0,314	0,071	0,030*	0,006*	0,536	0,536	0,232	0,016*	0,133	0,403	0,275	0,312	0,314
B: a_w	0,076	0,314	0,593	0,363	0,036*	0,103	0,045*	0,748	0,188	0,286	0,128	0,275	0,438	0,314
C: pH	1,000	0,314	0,593	1,000	0,147	1,000	0,536	0,063	0,356	0,133	0,403	0,451	0,438	0,020*
AA	0,000**	0,720	0,154	0,014*	0,023*	0,030*	0,193	0,565	0,016*	0,278	0,562	0,224	0,675	0,306
AB	1,000	0,465	0,167	0,511	1,000	1,000	0,391	0,651	0,504	0,020*	1,000	0,144	0,463	0,064
AC	1,000	0,465	1,000	0,511	1,000	0,391	1,000	0,209	0,210	0,052	0,253	1,000	0,463	0,465
BB	0,189	0,306	0,407	0,355	0,407	0,283	0,061	0,331	0,457	0,278	0,027*	0,443	0,952	0,720
BC	1,000	0,465	0,456	0,511	0,456	0,391	0,391	0,381	1,000	0,152	0,049*	1,000	0,708	0,465
CC	0,006*	0,306	0,407	0,355	0,057	0,089	0,776	0,477	0,195	0,702	0,562	0,443	0,515	0,306
ANOVA (Estadísticos R²)														
R²	98,42	62,50	72,36	84,11	90,60	79,57	77,86	72,36	86,87	86,47	82,95	66,91	49,25	82,35
R² ajustado	95,59	0	22,60	55,51	73,69	42,79	38,02	22,62	63,22	62,11	52,27	7,35	0	50,59
Valores óptimos de inhibición														
A: Temperatura	16,6	-	-	15,9	16,9	-	-	-	16,2	8,4	8,0	-	-	8,0
B: a_w	0,87	-	-	0,88	0,84	-	-	-	0,87	0,84	0,87	-	-	0,84
C: pH	5,00	-	-	4,98	4,80	-	-	-	5,20	4,50	4,50	-	-	5,50
Valor estimado	4,38	-	-	4,17	4,03	-	-	-	3,64	3,92	2,97	-	-	2,88

¹Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, PJ (*P. jadinii*), KM (*K. marxianus*) y KL (*K. lactis*), el número pertenece al código de cepa.

* Los valores *p* inferiores a 0,050 son estadísticamente significativos (letra negrita).

** Los valores *p* inferiores a 0,001 son estadísticamente significativos (letra negrita).

Tabla VII.6. Resultados ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta y condiciones óptimas en las que cada levadura obtendría un mejor control del crecimiento de *Mucor plumbeus* 2367.

	PJ173 ¹	KM364	KL371	PJ433	PJ659	KL874	KL890	KL904	PJ1008	KM1070	KL1098	KL1351	PJ1468	KL1507
A: Temperatura	0,015*	0,045*	0,001**	0,000**	0,005*	0,409	0,805	0,386	0,011*	0,805	0,536	0,285	0,014*	0,009*
B: a_w	0,015*	0,650	0,025*	0,148	0,140	0,409	0,471	0,555	0,213	0,035*	0,536	0,706	0,232	0,447
C: pH	1,000	0,819	0,175	0,256	0,245	0,574	0,346	0,175	0,334	0,346	1,000	1,000	0,7479	0,1596
AA	0,153	0,644	0,001**	0,001**	0,002**	0,326	0,619	0,084	0,021*	0,070	0,018*	0,020*	0,331	0,005*
AB	0,817	0,526	0,076	0,572	1,000	1,000	0,728	0,237	0,100	0,005*	0,391	0,151	0,651	1,000
AC	0,202	0,747	1,000	0,281	0,562	0,688	0,201	0,134	0,636	1,0001	1,000	1,000	1,000	0,296
BB	0,853	0,303	0,008*	0,086	0,412	0,609	0,418	0,429	0,939	0,014*	0,886	0,365	0,084	0,009*
BC	0,202	0,231	0,076	0,029*	1,000	0,688	1,000	0,673	1,000	1,000	1,000	1,000	0,651	0,296
CC	0,970	0,876	0,084	0,042*	0,778	0,384	0,619	0,685	0,228	0,418	0,486	0,670	0,477	0,488
ANOVA (Estadísticos R²)														
R²	87,07	69,58	96,88	97,84	92,61	49,64	52,16	74,93	87,58	91,18	73,93	77,91	82,18	93,13
R² ajustado	63,79	14,81	91,25	93,95	79,32	0	0	29,81	65,24	75,32	26,99	38,16	50,11	80,75
Valores óptimos de inhibición														
A: Temperatura	15,5	-	10,5	17,3	16,0	-	-	-	14,5	8,0	-	-	19,8	11,6
B: a_w	0,97	-	0,84	0,97	0,97	-	-	-	0,97	0,84	-	-	0,97	0,97
C: pH	4,50	-	4,50	5,50	5,50	-	-	-	4,81	4,80	-	-	5,50	5,50
Valor estimado	5,87	-	3,38	5,56	5,65	-	-	-	5,28	4,42	-	-	4,67	3,30

¹ Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, PJ (*P. jadinii*), KM (*K. marxianus*) y KL (*K. lactis*), el número pertenece al código de cepa.

* Los valores *p* inferiores a 0,050 son estadísticamente significativos (letra negra).

** Los valores *p* inferiores a 0,001 son estadísticamente significativos (letra negra).

VII.3.4 Caracterización de la actividad antagonista

Para la caracterización de la actividad antagonistas se realizaron diferentes ensayos a las levaduras seleccionadas con el objetivo de elucidar el mecanismo de acción de la actividad antifúngica de cada cepa. A continuación, se muestran los resultados de dichas pruebas y ensayos.

VII.3.4.1 Producción de compuestos volátiles antifúngicos (VOCs)

La producción de compuestos volátiles se realizó mediante un ensayo de doble placa y se realizaron mediciones durante 7 días. Los resultados obtenidos fueron muy variables dependiendo la especie y cepa evaluada. En primer lugar, en la **Figura VII.3** se representa el porcentaje de reducción de las levaduras seleccionadas frente a *P. commune* 1031. Entre las cepas evaluadas, solo una reducía el crecimiento de este moho, KL904 (*K. lactis* 904), pero esta reducción no fue significativa ($p \geq 0,05$). En cambio, el resto de las cepas estimularon el crecimiento micelial del moho, algunas de forma significativa ($p \leq 0,05$) a diferente nivel según la cepa.

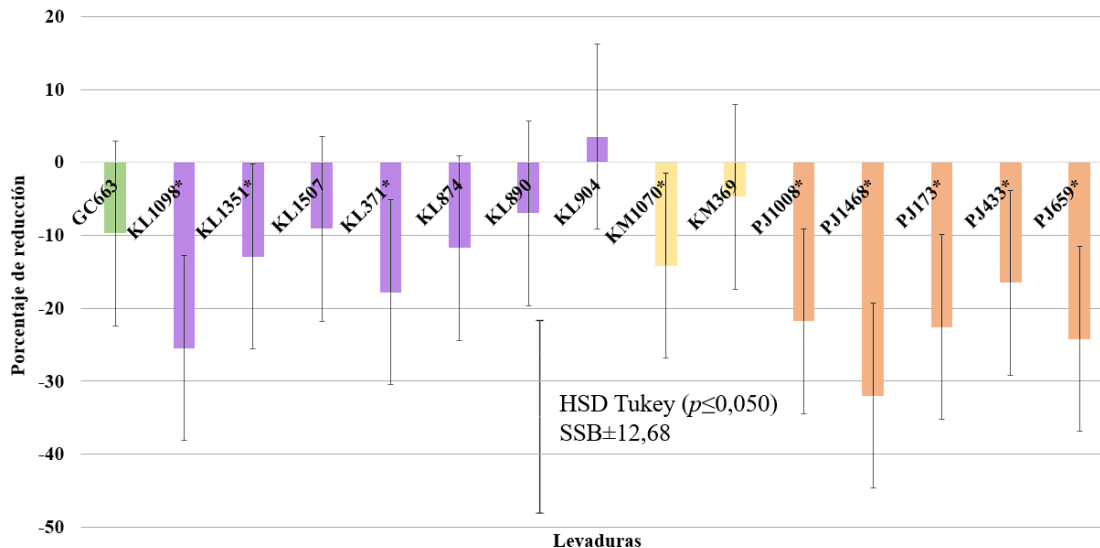


Figura VII.3. Porcentajes de reducción del crecimiento de *Penicillium commune* 1031 asociado a los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por las levaduras seleccionadas. En el eje de ordenadas, valores positivos significan reducción del crecimiento, valores negativos significan aumento del crecimiento micelial. Se distingue las especies por color, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * indica las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística.

En la **Figura VII.4** se muestra el impacto de los VOCs producidos por las cepas estudiadas sobre el crecimiento micelial de *F. verticillioides* 1191. Destacadamente, varias cepas fueron capaces de producir VOCs con capacidad de reducir su crecimiento (barras con valor positivo). Contrariamente, una cepa propició un mayor crecimiento del moho (PJ173). En relación con las levaduras que redujeron el crecimiento, la cepa que más destacó fue KL890, la cual redujo de manera significativa ($p \leq 0,050$) el crecimiento del moho en casi un 50%. En segundo, lugar se observa como la cepa KM1070 (*K. marxianus* 1070) también redujo de manera significativa el crecimiento del moho, como una reducción del 40%. La mayoría de las levaduras restantes se sitúan entre un 20 y 40% de reducción del crecimiento micelial. Concretamente, de mayor a menor reducción: KL904, KL1098, KL371, PJ 659, KM364, PJ433, PJ1008, KL1351 y KL1507. El resto de las cepas mostraron valores de reducción inferior al 10%.

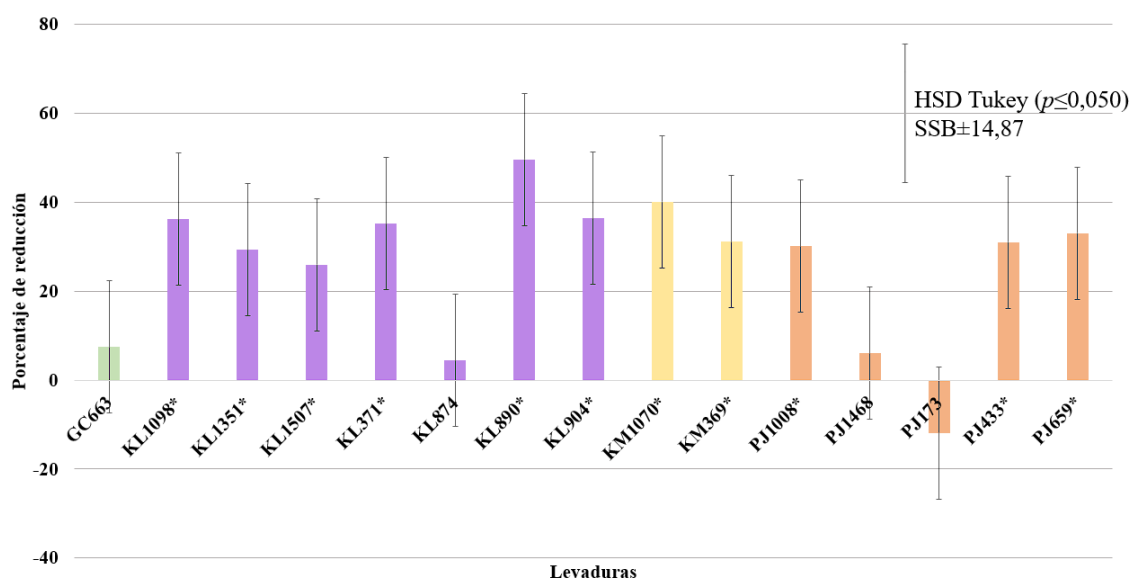


Figura VII.4. Porcentajes de reducción del crecimiento de *Fusarium verticillioides* 1191 asociado a los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por las levaduras seleccionadas. En el eje de ordenadas, valores positivos significan reducción del crecimiento, valores negativos significan aumento del crecimiento micelial. Se distingue las especies por color, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. *, indica las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística.

Por último, se investigó la capacidad de reducir el crecimiento de *M. plumbeus* 2367 mediante VOCs producidos por las cepas seleccionadas (**Figura VII.5**). Al igual que en el caso de *F. verticillioides* 1191, también se detectaron levaduras (5 cepas) con

Resultados

capacidad de reducir de forma significativa ($p \leq 0,050$) el crecimiento de este moho. En este caso la cepa más eficiente fue KL890, que redujo de forma significativa el crecimiento micelial del moho en un 30%. En segundo lugar, la cepa con mayor actividad mediante VOCs fue KM1070, reduciendo significativamente el crecimiento del moho en un 29%. En menor medida, las cepas KL1098, KL904 y KL371 redujeron significativamente ($p \leq 0,050$) el crecimiento en el rango del 27-22%, mientras que KL874 y PJ 433 lo hacían en aproximadamente el 5%. El resto de las cepas evaluadas (GC663, KL351, KL1507, KM364, PJ1008, PJ1468, PJ173 y PJ659) no mostraron actividad antifúngica mediante producción de VOCs o incluso estimularon significativamente ($p \leq 0,050$) el crecimiento de *M. plumbeus* 2367, destacando entre ellas la cepa PJ173, la cual aumentó el crecimiento micelial de este moho en valores de aproximadamente un 20%.

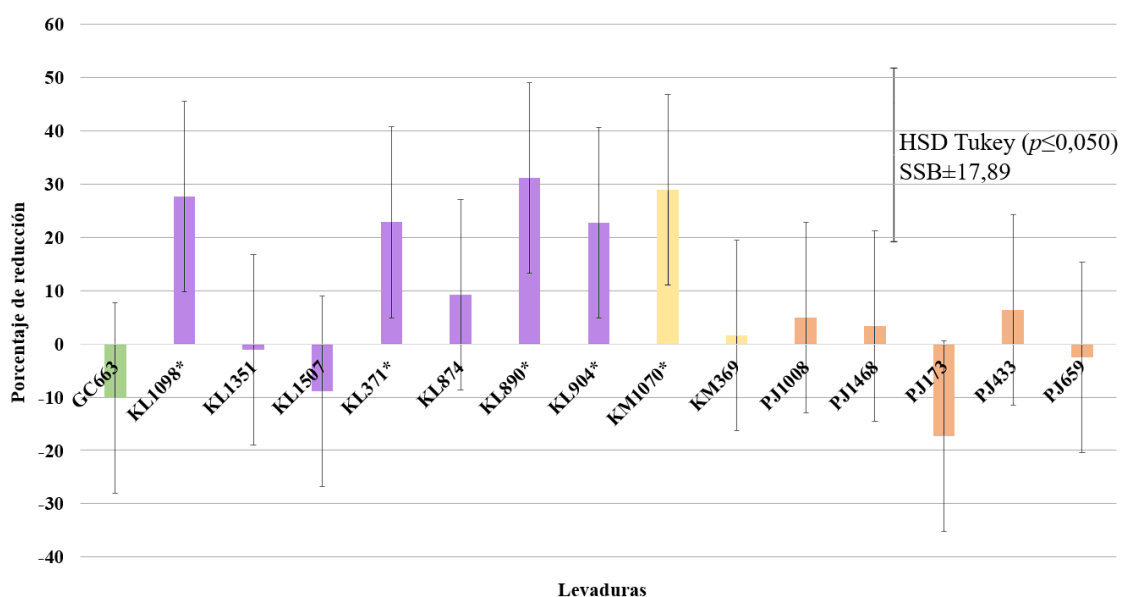


Figura VII.5. Porcentajes de reducción del crecimiento de *Mucor plumbeus* 2367 asociado a los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) producidos por las levaduras seleccionadas. En el eje de ordenadas, valores positivos significan reducción del crecimiento, valores negativos significan aumento del crecimiento micelial. Se distingue las especies por color, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * indica las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística.

Una vez se analizaron la actividad antifúngica mediante VOCs se evaluó los compuestos responsables de la actividad mediante GC-MS. Para ello, se seleccionaron las levaduras con mayor actividad antifúngica actividad antifúngica mediante VOCs, así

como levaduras sin actividad y se procedió a identificar y caracterizar estos VOCs. Como se muestra en la **Figura VII.6**, en el análisis se incluyeron un total de seis levaduras, tres positivas en inhibición por VOCs (KL890, KL904, y KM1070) y tres negativas (PJ173, YA1476 y CZ350) confrontadas a *Fusarium verticillioides* 1191. En el análisis de las componentes principales 1 (26,4% de la variabilidad) y componente principal 2 (15,6% de la variabilidad) pone de manifiesto que la CP1 estaba definida en su plano positivo por los aislados KM1070 y KL904 tras 7 días de confrontación, y se asoció la inhibición por VOCs a la producción de feniletanol y 1-butanol-3-metil propionato. La componente principal 2 estuvo definida en su plano positivo por los aislados KL890 y KL904 a los 3 días de confrontación, y se asoció su actividad a la presencia de etiléter y 2-feniletilacetato.

Resultados

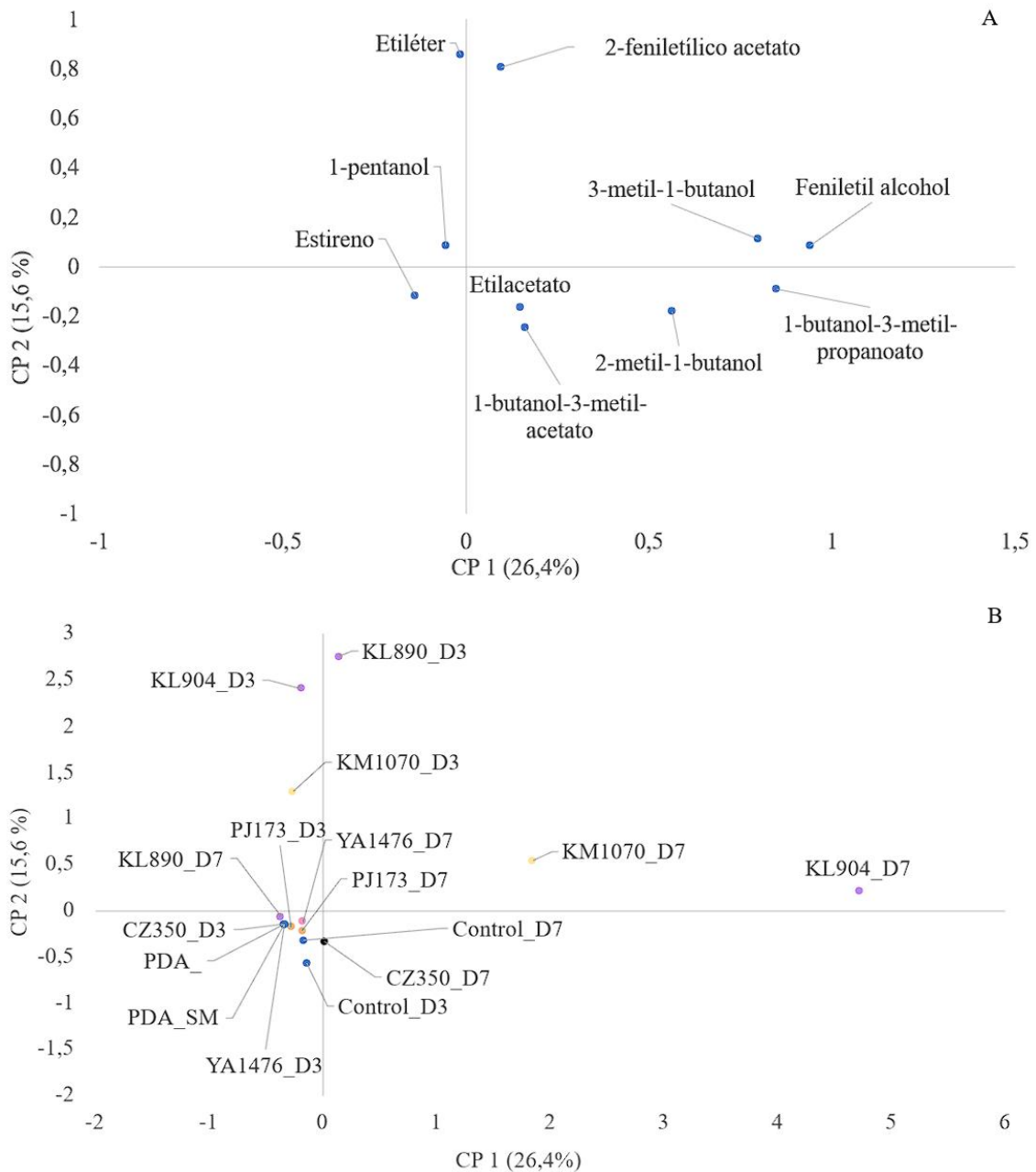


Figura VII.6. Análisis de los componentes principales 1 (26,4% de la variabilidad) y 2 (15,6% de la variabilidad) las confrontaciones (A) entre las levaduras *Kluyveromyces lactis* KL890, *Kluyveromyces lactis* KL904, *Kluyveromyces marxianus* KM1070, *Pichia jadinii* PJ173, *Yarrowia alimentaria* YA1476 y *Candida zeylanoides* CZ350 con el moho alterante *Fusarium verticillioides* 1191 a los 3 (D3) y 7 días (7D) de ensayo y los compuestos volátiles producidos en los espacios de cabeza (B). Los controles representan VOCs producidos por el crecimiento en el medio de los mohos alterantes en los ensayos sin levaduras. PDA representa los controles negativos sin inóculos.

VII.3.4.2 Efecto en la germinación de los conidios de los mohos alterantes

Para comprobar el efecto de las levaduras sobre la germinación de los conidios se hizo una co-inoculación en agar SM, y cuando el control, conidios del moho diana, llegó a una germinación del 90 % o superior se procedió a contabilizar los conidios de los mohos enfrentados a las levaduras. En cuanto al efecto en la germinación de *P. commune* 1031, nuevamente se observó un efecto inhibitorio de las levaduras frente a este moho (Figura VII.7). De hecho, al igual que ocurría en la evaluación del efecto de los VOCs sobre este moho, se observaron varias cepas de levaduras que incitaron a la germinación de los conidios de *P. commune*, sin encontrarse diferencias significativas con el control.

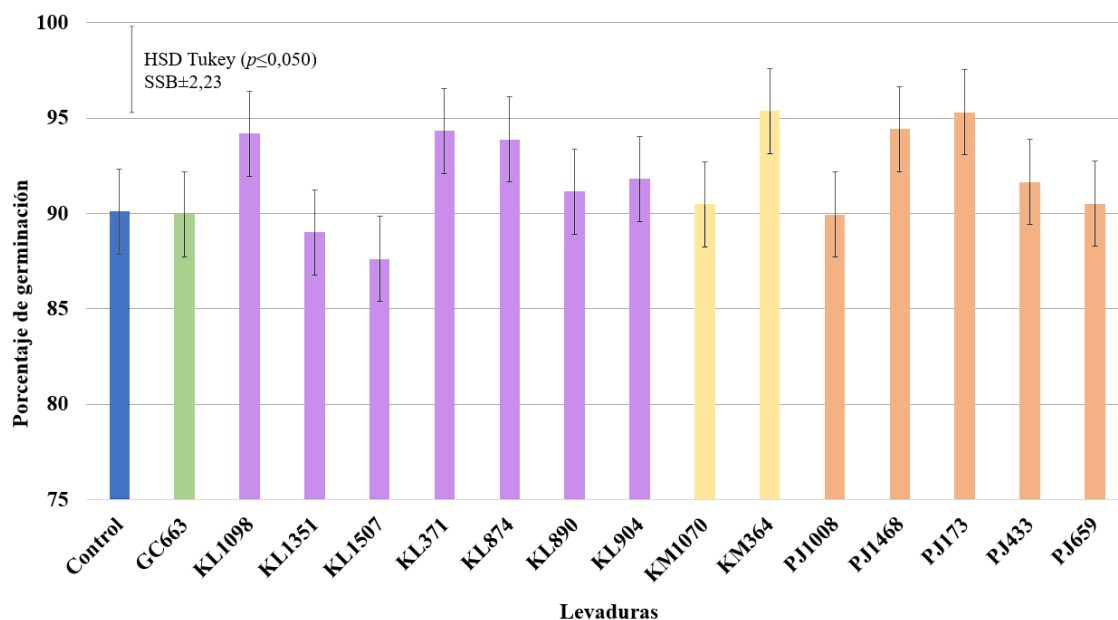


Figura VII.7. Porcentajes de germinación de *Penicillium commune* 1191 frente a las levaduras seleccionadas. Se distingue las especies por color, en azul el control, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. SSB: barra de significación estadística.

En contraposición a *P. commune* 1031, la germinación de los conidios de *F. verticillioides* 1191 se vio reducida significativamente ($p \leq 0,05$) por la acción de 11 de las 15 levaduras evaluadas (Figura VII.8). Entre ellas destacó la cepa KM 890, que redujo la germinación de este moho al casi el 20%. Otras cepas con actividad destacable fueron KL904, PJ173, PJ433, PJ659 y KM364, las cuales que redujeron la germinación de este moho al rango del 38 al 54 %. La reducción de la germinación de las otras 5

Resultados

levaduras con actividad fue claramente menor, mostrando valores de germinación en el rango del 62-85%.

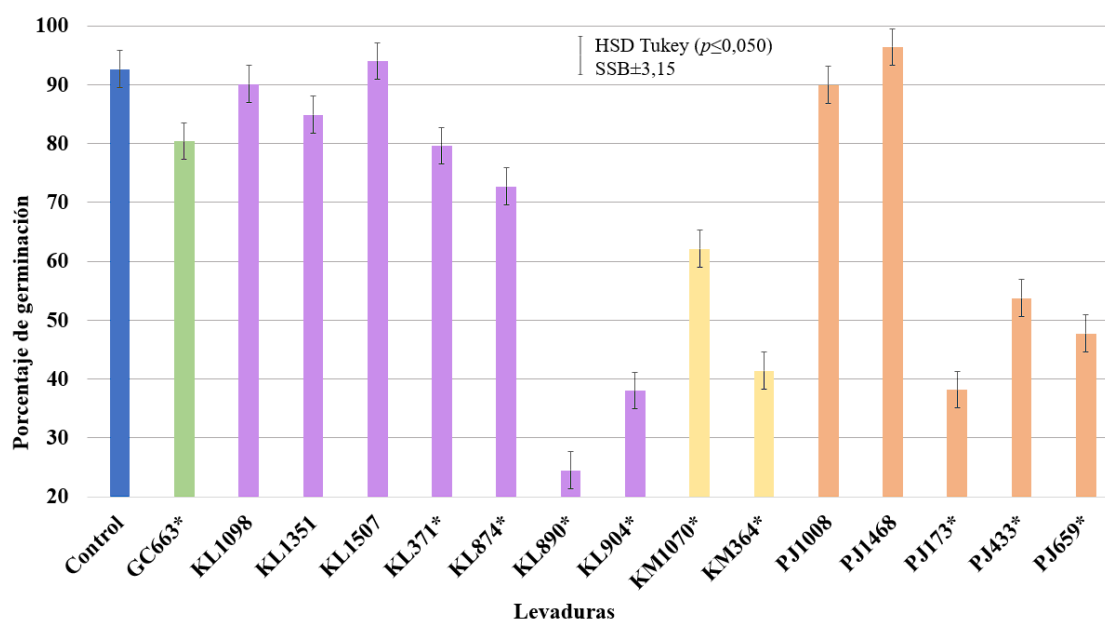


Figura VII.8. Porcentajes de germinación de *Fusarium verticillioides* 1191 frente a las levaduras seleccionadas. Se distingue las especies por color, en azul el control, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * representa las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística.

El último moho evaluado, *M. plumbeus* 2367, 11 de las 15 cepas evaluadas redujeron de forma significativa ($p \leq 0,05$) la germinación de este moho (**Figura VII.9**). En especial, la cepa PJ433 fue la que redujo de forma más destacada la germinación de este moho, alcanzando valores de germinación de aproximadamente el 40% respecto al control. Otras cepas con actividad fueron KL371, KL874, KL890, KL904 y KM364, las cuales limitaron la germinación del moho a valores entre el 48-58%. Por último, otras cinco levaduras, GC663, KL1351, KM1070, PJ1008 y PJ659 mostraron una reducción menor del moho, el cual mostró valores de germinación en presencia de las estas en el rango del 64-72%.

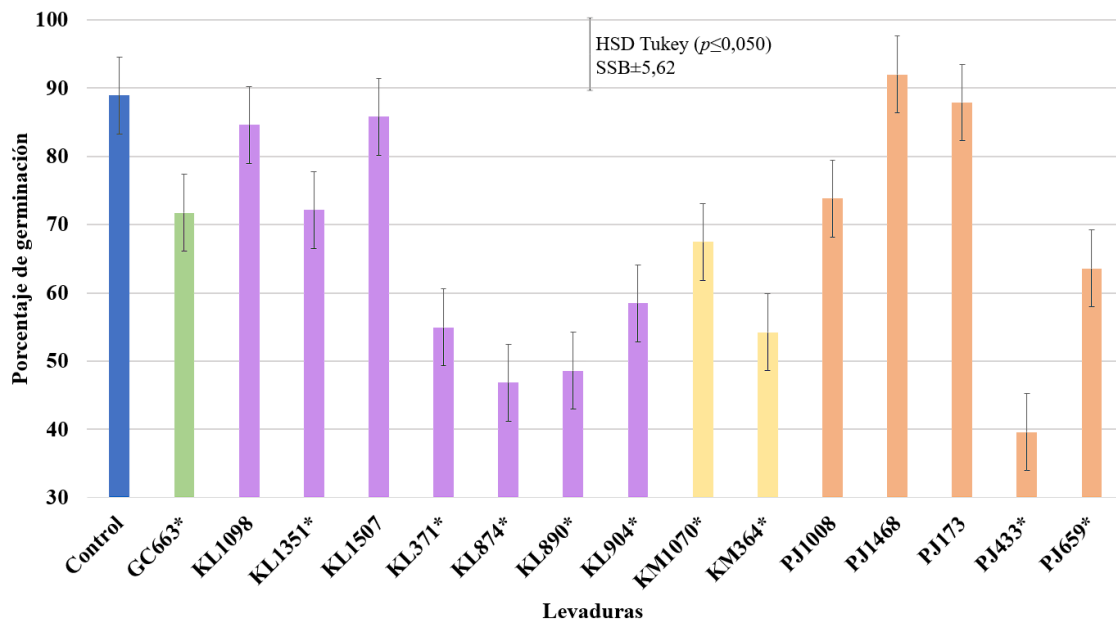


Figura VII.9. Porcentajes de germinación de *Mucor plumbeus* 2367 frente a las levaduras seleccionadas. Se distingue las especies por color, en azul el control, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. * representa las levaduras que tuvieron actividad significativa ($p \leq 0,050$). SSB: barra de significación estadística.

VII.3.4.3 Parasitismo directo

El parasitismo directo se investigó mediante la revisión microscópica del área de contacto entre los inóculos de levaduras y mohos. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la **Tabla VII.7**. Como podemos observar en esta tabla, la mayoría de las levaduras seleccionadas no presentaron adhesiones a las hifas de los mohos alterantes evaluados. Algunas cepas de la especie *K. lactis* mostraron capacidad de parasitar a las hifas de alguno de los mohos, como KL1507 que se adhirió al micelio de *P. commune* 1031 o KL904 que se unió a las hifas de *F. verticillioides* 1191. Por su parte, aislados de *P. jadinii* presentaron parasitismo frente a las hifas de 2 mohos, concretamente la cepa PJ433 se adhirió a las hifas de *P. commune* 1031 y *F. verticillioides* 1191, mientras otras aislados de esta especie consiguieron adherirse a un único moho.

Resultados

Tabla VII.7. Resultados del análisis de parasitismo de las cepas de levaduras frente a los mohos *Penicillium commune* 1031, *Fusarium verticillioides* 1191 y *Mucor plumbeus* 2367.

	<i>P. commune</i> 1031	<i>F. verticillioides</i> 1191	<i>M. plumbeus</i> 2367
GC663^{1,2}	+	+	+
KL1098	-	-	-
KL1351	-	-	-
KL1507	+	-	-
KL371	-	-	-
KL874	-	-	-
KL890	-	-	-
KL904	-	-	+
KM1070	-	-	-
KM364	-	-	-
PJ1008	-	+	-
PJ1468	-	+	-
PJ173	-	-	+
PJ433	+	+	-
PJ659	-	-	-

¹Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, GC (*Geotrichum candidum*), PJ (*Pichia jadinii*), KM (*Kluyveromyces marxianus*) y KL (*Kluyveromyces lactis*), el número pertenece al código de cepa.

² +significa capacidad de adhesión a las hifas, - significa ausencia de parasitismo.

Además de las cepas anteriormente descritas, la cepa GC663 fue la única que presentó la capacidad de parasitar las hifas de los tres mohos evaluados (**Figura VII.10**).

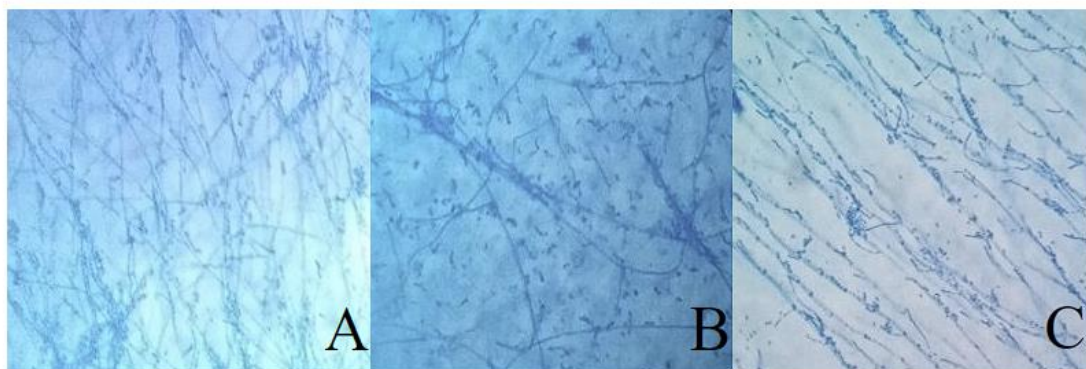


Figura VII.10. Imagen de la adhesión de *Geotrichum candidum* 663 a los diferentes mohos *Penicillium commune* 1031 (A), *Fusarium verticillioides* 1191 (B), y *Mucor plumbeus* 2367 (C).

VII.3.4.4 Producción de sustancias antifúngicas extracelulares: antibiosis y enzimas líticas

Antibiosis

En los ensayos realizados en esta Tesis Doctoral con los sobrenadantes obtenidos del crecimiento de las levaduras antagonistas en caldo SM con y sin la presencia del mohogruño no se observaron efectos inhibitorios sobre ninguno de los mohos alterantes evaluados.

Enzimas líticas

Las diferentes cepas de levaduras fueron investigadas en cuanto a la capacidad de producir diferentes actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de la pared celular como las actividades pectinasa, β -glucanasa, quitinasa y proteasa a 15 y 25°C. En general se observó que todas las cepas de una misma especie mostraron capacidades enzimáticas similares (**Tabla VII.8**). La cepa GC663 destacó por actividad pectinasa y β -glucanasa. Las cepas de la especie *K. lactis* se caracterizaron por mostrar actividad proteasa a 15°C y en menor medida a 25°C. Contrariamente, la actividad proteasa no fue detectada en la otra especie del género *Kluyveromyces*, *K. marxianus*. Finalmente, en relación con las cepas de la especie *P. jadinii*, las actividades enzimáticas que mostraron fueron variables entre las cepas evaluadas. Todas las cepas de esta especie mostraron a diferente nivel actividad β -glucanasa, sin embargo, interesantemente, la cepa PJ1008 mostró además actividad pectinasa y las cepas PJ433 y PJ1468 actividad proteasa.

Resultados

Tabla VII.8. Intensidad de las actividades enzimáticas pectinasa, β -glucanasa, quitinasa y proteasa de las diferentes levaduras aisladas.

	Pectinasa	β -glucanasa	Quitinasa	Proteasa 25°C	Proteasa 15°C
GC663 ¹	+++ ²	+++	-	-	-
KL1098	-	-	-	++	+
KL1351	-	-	-	++	++
KL1507	-	-	-	++	+++
KL371	-	-	-	-	+
KL874	-	-	-	-	++
KL890	-	-	-	-	++
KL904	-	-	-	-	+
KM1070	-	-	-	-	-
KM364	+	-	-	-	-
PJ1008	++	++	-	-	-
PJ1468	-	+	-	+	+
PJ173	-	+	-	-	-
PJ433	-	++	-	++	++
PJ659	-	++	-	-	-

¹Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, GC (*Geotrichum candidum*), PJ (*Pichia jadinii*), KM (*Kluyveromyces marxianus*) y KL (*Kluyveromyces lactis*), el número pertenece al código de cepa.

² + indica el diámetro del halo (+, de 1 a 8 mm; ++, de 9 a 17 mm; +++ 18 a 26 mm).

VII.3.4.5 Producción de biofilm

La capacidad de formación de biofilm se determinó en base a la capacidad que tienen las levaduras de adherirse al fondo de los pocillos de placas de poliestireno y retener el colorante cristal violeta. Para ello se utilizó como referencia una levadura positiva en esta actividad mediante estudios previos del proyecto IB1638 del grupo CAMIALI (*K. marxianus* 2459). En la **Figura VII.11** se muestra la capacidad de formar biofilm de las 15 levaduras seleccionadas en comparación con el control positivo.

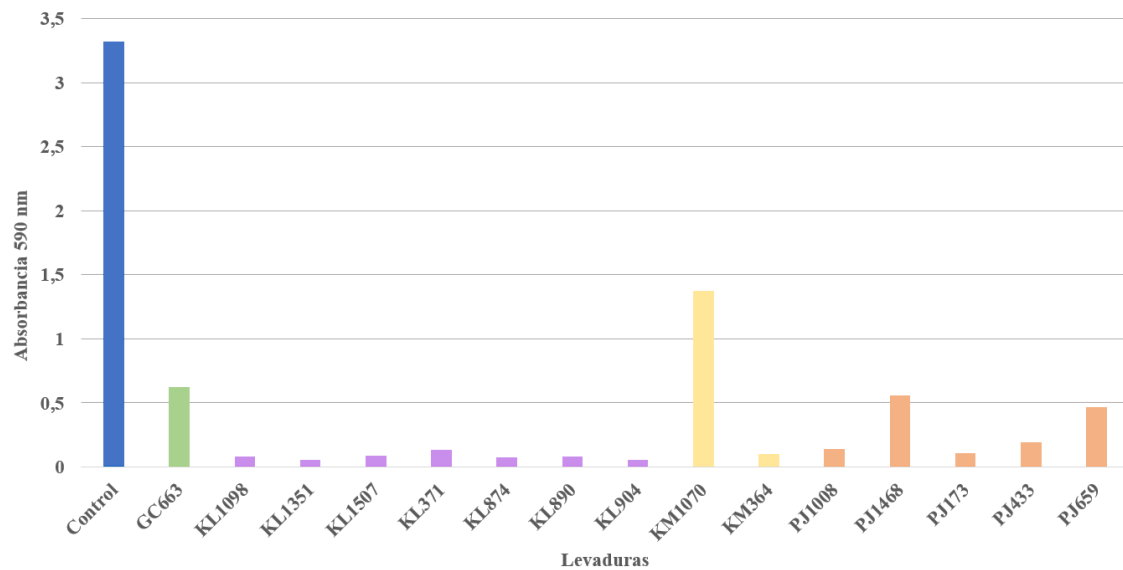


Figura VII.11. Determinación de la capacidad de formar biofilm (expresado en valores de absorbancia a 590 nm). Se distingue las especies por color, en azul el control, la cepa *Kluyveromyces marxianus* 2459, en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *P. jadinii*.

Como se puede observar en la **Figura VII.11**, la mayor capacidad de formar biofilm se encontró en el control positivo, con absorbancias superiores a 3. Entre las cepas de levaduras de este estudio, se determinó que KM1070 presentó moderada capacidad de producir biofilm, mientras que el resto no presentaron esta capacidad.

VII.3.4.6 Efecto de la concentración de hierro y manganeso sobre la actividad antagonista

La competición por nutrientes, Fe y Mn, de las diferentes cepas seleccionadas que mostraron halo de inhibición se investigó utilizando como moho de referencia *M. plumbeus* 2367 se comprobó mediante la inclusión en el medio de cultivo de dos elementos. Los resultados obtenidos se muestran en el mapa de calor representado en la **Figura VII.12**. En él se representan los resultados de la evaluación de diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) hierro en naranja y en gris el manganeso. Los resultados mostraron dos grandes agrupamientos de levaduras, por un lado, las cepas que mostraron actividad antagonista por competición por nutrientes y por otro lado las cepas que no mostraron esta actividad. Dentro del primer clúster, las 5 cepas que lo componen pertenecen a la misma especie, *K. lactis* (KL 371, KL904, KL 874, KL 1351 y KL1098). Estos aislados presentaron actividad en la confrontación control sin adición de los

Resultados

microelementos, pero ésta disminuía claramente a medida que aumentaba la concentración de los diferentes elementos. Estos resultados revelan que la competición por Fe y Mn es relevante en el antagonismo de estas cepas, ya que a medida que se encuentran un exceso estos nutrientes la capacidad de inhibir a los mohos disminuye o desaparece. Como excepción, la cepa KL1351, la cual, si mostró inhibición del moho a medida que aumentaba la concentración de hierro, por tanto, la competición de esta cepa fue únicamente respecto al manganeso.

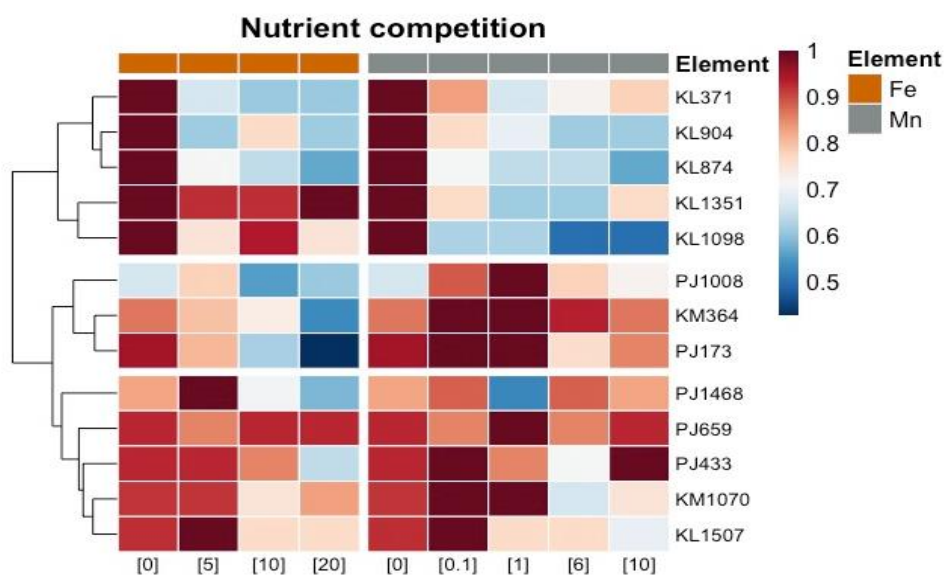


Figura VII.12. Mapa de calor de la capacidad de competir por hierro (naranja) y manganeso (gris) de las diferentes levaduras seleccionadas por halo de inhibición a las concentraciones reflejadas en el eje inferior (en µg/mL) enfrentadas a *Mucor plumbeus* 2367. Los datos utilizados en el mapa térmico son la abundancia relativa de los diferentes halos producidos. Tanto en las columnas como en las filas se agrupan utilizando la distancia euclidiana y el enlace medio. La escala de varianza unitaria se aplica a las filas. La escala de colores representa la escala de abundancia relativa de la intensidad del halo de las diferentes cepas (PJ, *Pichia jadinii*; GC, *Geotrichum candidum*; KL, *Kluyveromyces lactis*; KM, *Kluyveromyces marxianus*), con el color rojo oscuro indicando una abundancia alta y con azul oscuro, nula abundancia.

En el segundo clúster agrupó las levaduras donde la competición por nutrientes tuvo una menor relevancia en su mecanismo de inhibición. Dentro de este cluster, hay dos divisiones más, por un lado las cepas que solo compitieron por el hierro y por el otro las cepas que no compitieron por ninguno de los nutrientes. En el primer subgrupo se incluyeron las cepas PJ1008, PJ173 y KM364. En el segundo subgrupo de este cluster incluye cinco cepas (PJ433, PJ659, PJ1468, KL1597 y KM1070), y se caracteriza porque

todas las levaduras tienen actividad antagonista a diferente nivel independientemente de la concentración de los elementos investigados, por tanto se deduce que, la forma de controlar el crecimiento del moho de estas levaduras no es dependiente exclusivamente de la competición por nutrientes y otros mecanismos están también implicados.

VII.3.5 Evaluación *in vivo* de las levaduras seleccionadas

En el ensayo *in vivo* se utilizaron las levaduras que mostraron mayor capacidad antagonista en el apartado VII.2.4 de este capítulo. Además, se utilizó como control positivo de inhibición natamicina y como control negativo una cepa que no presentó actividad en ninguno de los ensayos anteriores, PK1241 (*Pichia kudriavzevii* 1241). Los resultados de los enfrentamientos entre las levaduras y los tres mohos investigados se presentan las figuras siguientes, **Figura VII.13 y Figura VII.14** (*P. commune* 1031), **Figura VII.15 y Figura VII.16** (*F. verticillioides* 1191) y **Figura VII.17 y Figura VII.18** (*M. plumbeus* 2367).

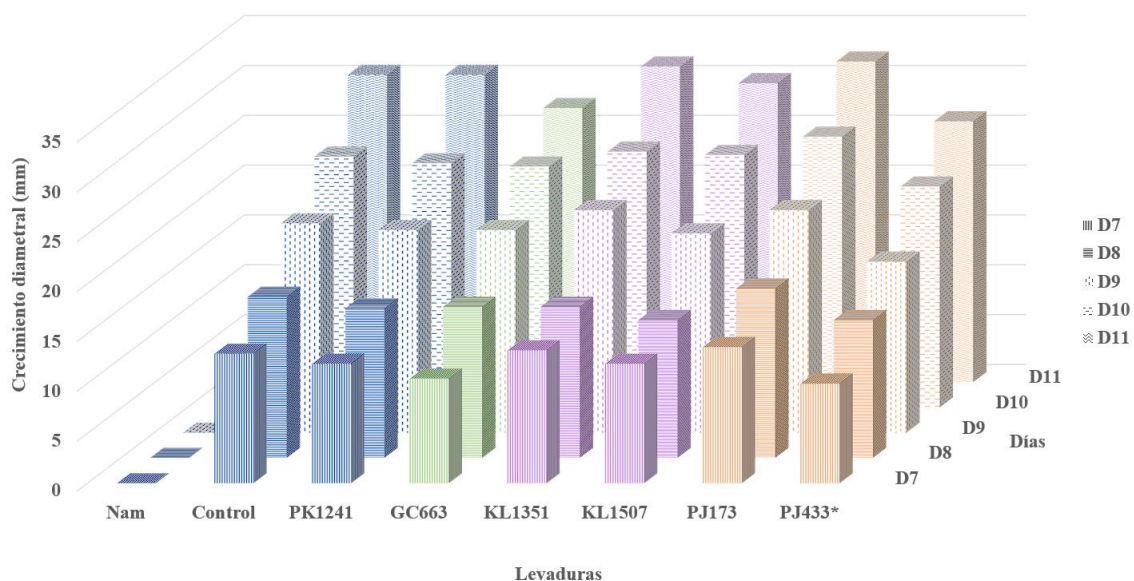


Figura VII.13. Crecimiento diametral de *Penicillium commune* 1031 frente a las levaduras investigadas a lo largo de los 11 días de confrontación en cuñas de queso tierno. Se distingue las especies por color: en azul los controles Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, cepa control sin actividad; en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. Los diferentes días de crecimiento se muestran con diferentes texturas. * indica las cepas de levaduras que produjeron inhibición significativa ($p \leq 0,050$).

Resultados



Figura VII.14. Ensayo *in vivo* en queso tierno de *Penicillium commune* 1031 en el día 9 del ensayo. Se distingue: Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, GC663 = *Geotrichum candidum* 663, KL1351 = *Kluyveromyces lactis* 1351, KL1507 = *K. lactis* 1507, PJ171 = *Pichia jadinii* 173; PJ433 = *P. jadinii* 433.

En relación con *P. commune* 1031, se observa como las confrontaciones en las cuñas de queso (**Figura VII.14**) entre el control negativo (PK1241) y el moho no redujo el desarrollo del moho respecto al control. Del mismo modo ocurrió con las cepas KL1351, KL1597 y PJ173, las cuales tuvieron un crecimiento semejante al control. Notablemente, dos cepas redujeron el crecimiento micelial del moho. Por un lado, la cepa GC663 disminuyó el tamaño medio del micelio del moho, pero esta reducción no mostró ser estadísticamente diferente al control ($p \geq 0,05$) aunque sí disminuyó el tamaño medio del micelio, y por otro lado se observó como la levadura PJ433 consiguió reducir significativamente el crecimiento del moho ($p \leq 0,05$). Concretamente, PJ433 a los 11 días de confrontación redujo el diámetro del micelio de *P. commune* en aproximadamente 5 mm.

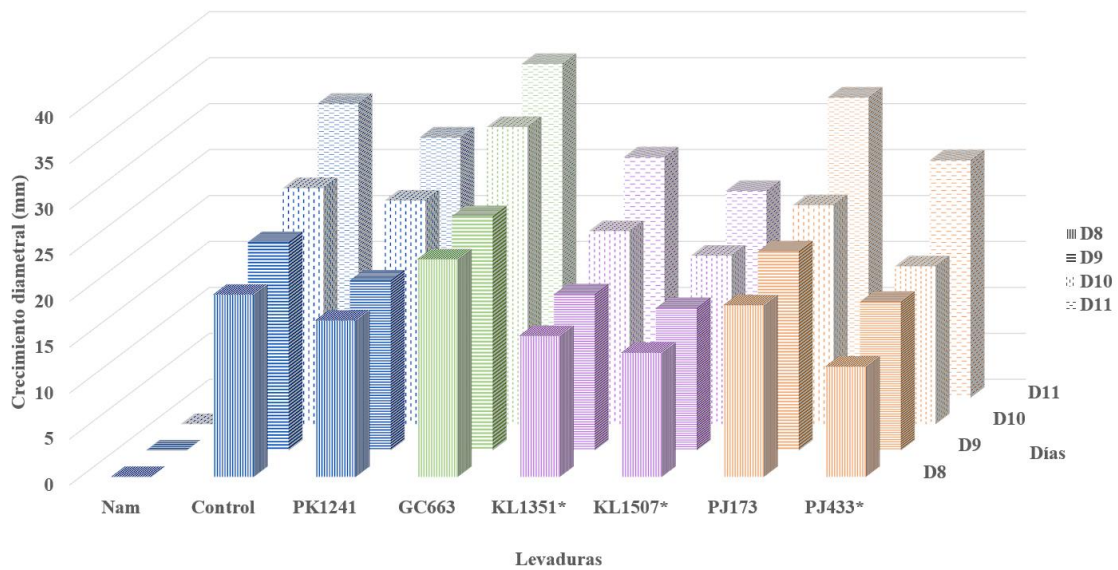


Figura VII.15. Crecimiento diametral de *Fusarium verticillioides* 1191 frente a las levaduras investigadas a lo largo de los 11 días de confrontación en cuñas de queso tierno. Se distingue las especies por color: en azul los controles Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, cepa control sin actividad; en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. Los diferentes días de crecimiento se muestran con diferentes texturas. * indica las cepas de levaduras que produjeron inhibición significativa ($p \leq 0,050$).

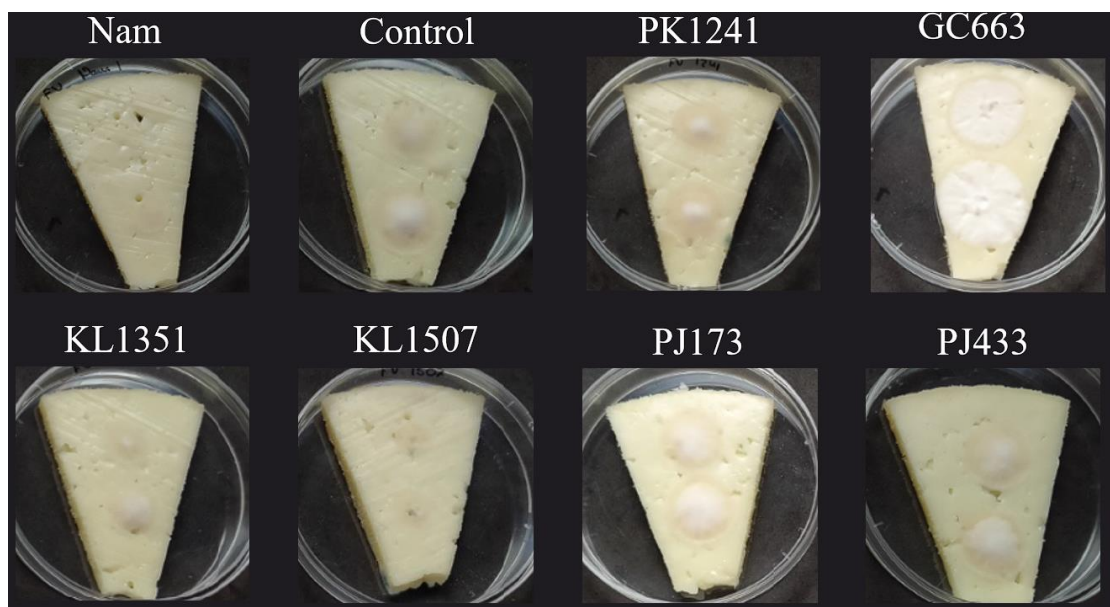


Figura VII.16. Ensayo *in vivo* en queso tierno de *Fusarium verticillioides* 1191 en el día 9 del ensayo. Se distingue: Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, GC663 = *Geotrichum candidum* 663, KL1351 = *Kluyveromyces lactis* 1351, KL1507 = *K. lactis* 1507, PJ171 = *Pichia jadinii* 173; PJ433 = *P. jadinii* 433.

Resultados

Respecto a *F. verticillioides* 1191, en la **Figura VII.15** se puede observar cómo 3 cepas consiguieron controlar el crecimiento del moho de manera significativa ($p \leq 0,050$). La cepa con mayor actividad fue KL1507, la cual redujo el crecimiento del moho a los 11 días de ensayo en aproximadamente 10 mm. Las otras dos cepas con actividad antifúngica significativa KL1351 y PJ433, las cuales redujeron de manera similar el crecimiento de este moho, aproximadamente 5 mm a los 11 días de ensayo. Por el contrario, además se encontraron dos cepas que fomentaron el crecimiento del moho, como son GC663 y PJ173 (**Figura VII.16**), en presencia de las cuales el moho aumentó su crecimiento micelial respecto.

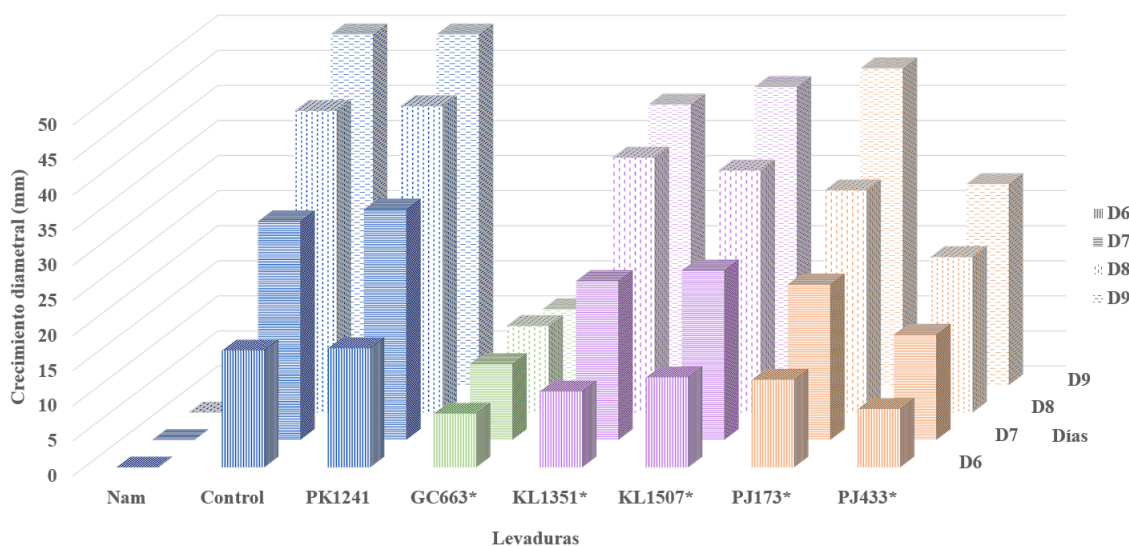


Figura VII.17. Crecimiento diametral de *Mucor plumbeus* 2367 frente a las levaduras investigadas a lo largo de los 11 días de confrontación en cuñas de queso tierno. Se distingue las especies por color: en azul los controles Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, cepa control sin actividad; en verde *Geotrichum candidum*, en lavanda *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *Kluyveromyces marxianus* y en naranja *Pichia jadinii*. Los diferentes días de crecimiento se muestran con diferentes texturas. * indica las cepas de levaduras que produjeron inhibición significativa ($p \leq 0,050$).

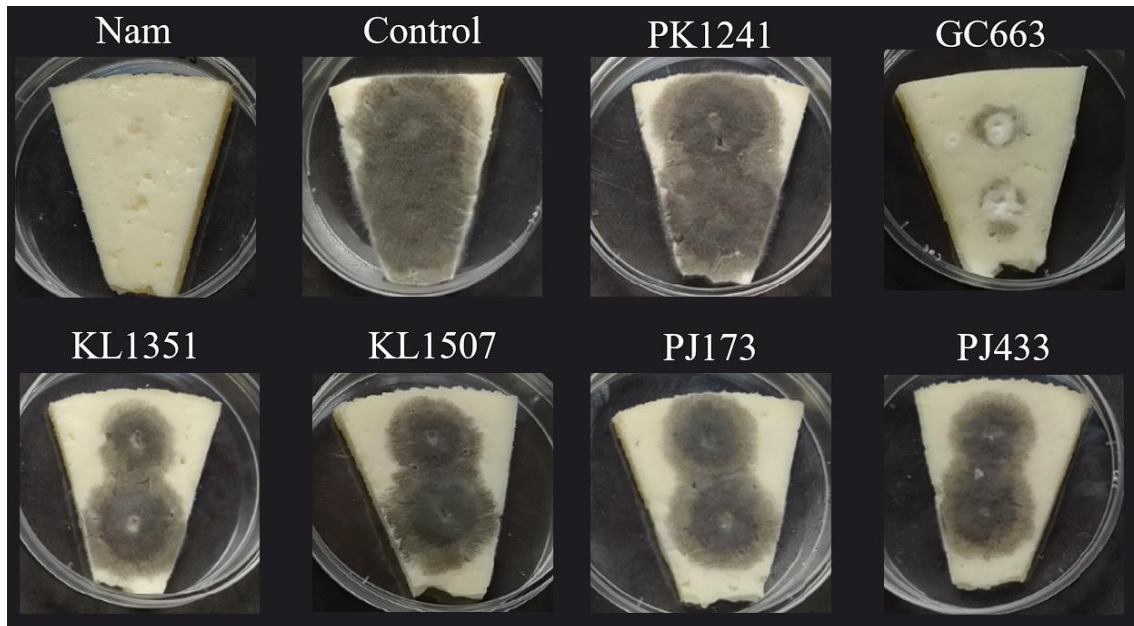


Figura VII.18. Ensayo *in vivo* en queso tierno de *Mucor plumbeus* 2367 en el día 8 del ensayo. Se distingue: Nam = natamicina; Control = moho sin coinoculación; PK1241 = *Pichia kudriavzevii* 1241, GC663 = *Geotrichum candidum* 663, KL1351 = *Kluyveromyces lactis* 1351, KL1507 = *K. lactis* 1507, PJ171 = *Pichia jadinii* 173; PJ433 = *P. jadinii* 433.

Por último, en la **Figura VII.17** se muestra el resultado de la confrontación de las cepas seleccionadas frente al moho *M. plumbeus* 2367. Las cinco cepas seleccionadas redujeron de manera significativa ($p \leq 0,050$) el crecimiento del moho. Entre ellas la cepa GC663 fue la que mostró una mayor actividad, reduciendo en más de 25 mm el crecimiento diametral del moho a los días del ensayo. La siguiente levadura que destaca, es la cepa PJ433, que redujo en casi 15 mm el crecimiento del moho a los 11 días. Esta levadura fue la única que mostró reducir de forma significativa el crecimiento de los 3 mohos alterantes. Finalmente, las dos levaduras de la especie *K. lactis* (KL1507 y KL1351) y PJ173 mostraron una actividad similar en los primeros 7 días de ensayo, reduciendo el crecimiento del moho en aproximadamente 7 mm. Sin embargo, al final del ensayo la reducción proporcionada por estas cepas fue más variable (**Figura VII.18**), estando en el rango de 5-10 mm dependiendo la cepa.

VII.4 Discusión

La presencia de mohos en la industria quesera puede suponer un grave problema desde el prisma de la calidad y seguridad. Los principales mohos asociados al queso pertenecen a los géneros *Penicillium* y menor medida otros géneros como *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, entre otros. Algunas de estas especies presentes en el queso son productoras de micotoxinas, como la esterigmatocistina, el ácido ciclopiazónico o la ocratoxina A. Una vez sintetizados, los procesos de transformación y conservación del queso no destruyen estos compuestos (Kure y Skaar, 2019; Shi y Maktabdar, 2022). En cuanto a la calidad, la alteración de diferentes tipos de quesos por mohos es un hecho ampliamente documentado. La consecuencia del crecimiento de mohos alterantes en queso es tanto la aparición de defectos visibles como manchas, coloraciones anómalas, y micelio, como defectos en el aroma y sabor. Los mohos asociados a la alteración son numerosos e incluyen a miembros de los géneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Byssochlamys* y *Geotrichum* (ICMSF, 2005). Por ejemplo, Liu y Tsao (2009^a) señalaron como especies fúngicas alterantes de quesos miembros de *Aspergillus*, *Penicillium candidum*, *Penicillium roqueforti*, *Byssochlamys nivea*, y *Cladosporium* sp. Consentino *et al.* (2018) investigaron la aplicación de bacterias ácido-lácticas (BAL) para el control de *Penicillium chrisogenum* y *Aspergillus flavus* en queso Caciotta. Huang *et al.* (2021) apuntan que entre los mohos alterantes más habituales de queserías danesas se encuentran *Cladosporium inversicolor*, *Cladosporium sinuosum*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor racemosus*, y *Penicillium roqueforti*. Como se puede observar, existe un amplio grupo de especies de mohos alterantes de quesos. En el presente trabajo, en quesos de pasta blanda de leche cruda de oveja con DOP producidos en Extremadura los mohos asociados con la alteración fueron identificados como *F. verticillioides*, *M. plumbeus* y *P. commune*. Estas especies han sido previamente asociadas a alteraciones de quesos de diferentes tipos. Respecto a *Fusarium*, Bachmann *et al.* (2005) caracterizaron la presencia de *Fusarium domesticum* con la producción de manchas pegajosas en quesos suizos. Además, la contaminación por especies de este género ha sido asociado a su presencia en las muestras de leche. Así, Marín *et al.* (2015) encontraron que *Fusarium*, y en concreto *F. verticillioides*, era predominante en las leches y los quesos de menos de un mes de maduración en la región de Castilla-La Mancha. En cuanto a las especies del género *Mucor*, algunas de ellas son apreciadas por las deseables propiedades que otorgan a los

quesos. Sin embargo, otras producen aromas y texturas anómalas y descoloraciones (Hayaloglu y Kirbag, 2007; Montagna *et al.*, 2004; Morin-Sardin *et al.*, 2016), produciendo la alteración conocida como pelo de gato. Finalmente, *P. commune* ha sido señalado como una de las principales especies fúngicas asociadas a la alteración de diversos quesos por Cheong *et al.* (2014), Garnier *et al.* (2017^b) y Mareza *et al.* (2022). Además, estos autores ensalzan la resistencia de esta especie frente al biocontrol ejercido por BAL respecto a otras especies de *Penicillium* asociadas a alteración de quesos. En quesos cheddar envasados al vacío, además de *P. commune*, se han identificado como especies alterantes *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *P. glabrum* y *Phoma* sp. (Hocking y Faedo, 1992).

Para el control de los mohos alterantes en quesos las estrategias más ampliamente evaluadas han sido el envasado en atmósferas modificadas y la aplicación de conservantes como ácido benzoico, benzoato sódico, sorbato potásico y natamicina (Kallinteri *et al.*, 2013; Ledenbach y Marshall, 2009). Sin embargo, estas técnicas pueden no ser del todo adecuadas ya que la efectividad de las atmósferas modificadas puede depender de la especie o cepa fúngica a controlar (Van Long *et al.*, 2016). Por otro lado, la aparición de cepas resistentes a los conservantes antimicrobianos es cada vez más frecuente (Brul y Cloote, 1999; Streekstra *et al.*, 2016). A estos factores se le debe sumar los deseos de los consumidores cada vez más extendidos de consumir alimentos “libres” o con el menor contenido de sustancias químicas sintéticas. Es por este motivo que han proliferado en los últimos años los trabajos encaminados a garantizar la calidad y seguridad de quesos basados en métodos “naturales”. En este sentido, la utilización de microorganismos antagonistas cumple con las premisas de controlar la alteración fúngica en quesos y eliminar la aplicación de sustancias químicas. BAL (Cheong *et al.*, 2014; Consentino *et al.*, 2018; Mareze *et al.*, 2022; Shi y Maktabdar, 2022), levaduras (Huang *et al.*, 2021) y mohos (Delgado *et al.*, 2016) de diferentes especies han sido propuestos como agentes de control biológico para reducir las alteraciones fúngicas en diferentes tipos de quesos. Queda claro que, hasta la fecha, las BAL han sido los microorganismos más explorados para el control de mohos alterantes en quesos. Sin embargo, en los últimos años las levaduras han ganado más interés por sus propiedades y diversidad como antagonistas en diferentes matrices alimentarias (Hernández-Montiel, 2021; Hernández *et al.*, 2022; Mukherjee *et al.*, 2020).

Discusión

En la presente Tesis Doctoral, se evaluaron los efectos antagonistas *in vitro* de 84 cepas de levaduras frente a los tres mohos alterantes obtenidos en este trabajo. De acuerdo con la revisión de Sipiczki (2023), la confrontación directa en placa con el organismo diana es uno de los métodos más efectivos y técnicamente sencillos para evaluar la potencial capacidad antagonista de un microorganismo. Según esta metodología, dos grandes grupos de levaduras fueron obtenidas asociados a las actividades observadas y en las condiciones físico-químicas de pH, a_w y % NaCl. Según este agrupamiento, las cepas con potencial para ser cultivos bioprotectores en quesos pertenecían a las especies *P. jadinii*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *G. candidum*. Los resultados fueron sorprendentes en el sentido de que 5 acepas de *P. jadinii* presentaron actividades destacables frente a dos de los tres mohos diana. De hecho, los aislados de esta especie fueron los que presentaron los mayores halos medios de inhibición frente a los mohos alterantes, de tal manera que 4 de los 5 aislamientos seleccionados de *P. jadinii* presentaron halos superiores a 2 mm frente a *F. verticillioides* y a 3 mm frente a *M. plumbeus*. Sin embargo, la bibliografía consultada no define a esta especie como una especie común con potencial antagonista. Hasta la fecha, según nuestros conocimientos, solo una cepa de esta especie (*Cyberlindnera/Pichia jadinii* 273 (Y273)) ha sido reportada con actividad antagonista destacable frente a mohos toxigénicos del género *Aspergillus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus flavus*, mediante la producción de VOCs (Farbo *et al.*, 2018; Fiori *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2021). Por otro lado, las cepas de *D. hansenii* no presentaron una actividad antifúngica destacable, aunque los trabajos de Arrarte *et al.* (2022), da Cruz *et al.* (2021), García-Bramasco *et al.* (2022), Núñez *et al.* (2015), entre otros, muestren cepas con destacables propiedades antifúngicas de esta especie. Por su parte, la especie *K. lactis* ha sido previamente descrita como productora de compuestos antifúngicos, concretamente micocinas (Golubev, 2013) activas en rangos de pH de 6 a 9. Además, se ha determinado actividades específicas de esta levadura para el control y la supresión en la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* (Ghanbari *et al.*, 2019), y *P. expansum* (Taczman-Brückner *et al.*, 2005^a). En cuanto a *K. marxianus*, también se ha demostrado la capacidad de producir compuestos volátiles anti *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Alasmar *et al.*, 2020). Además de la síntesis de compuestos volátiles, Zheng *et al.* (2023) identificaron la capacidad de *K. marxianus* de controlar a *P. expansum* mediante competición por espacio y nutrientes, parasitismo y antibiosis. Finalmente, la última especie de levadura agrupada por su intensa actividad antifúngica, *G. candidum*,

ha sido previamente descrita como productora de compuestos volátiles antifúngicos (Mookherjee *et al.*, 2018).

Un aspecto esencial a la hora de seleccionar potenciales agentes de biocontrol es evaluar su respuesta antagonista en función de las condiciones ambientales que puedan desarrollarse en el nicho en el que se pretende que realicen la función. Una cepa antagonista debe estar bien adaptada y presentar respuesta a los diferentes estreses de tipo abiótico que se den en el entorno de colonización (Fredlund *et al.*, 2002; Ippolito y Nigro, 2000). En este sentido, en la revisión realizada por Sui *et al.* (2015) se indican los principales factores abióticos, en función del ambiente, en los que es necesario evaluar la respuesta antagonista en la selección de cepas con alta idoneidad, entre los que se encuentra la temperatura, condiciones redox, pH, a_w , etc. Para tal fin, en esta Tesis Doctoral se modelizó el comportamiento de las cepas seleccionadas en función de los principales parámetros físico-químicos que se ven modificados durante la elaboración y maduración del queso como son la temperatura, pH y a_w . Los resultados mostraron que la actividad antagonista de las cepas de *P. jadinii* se vio fundamentalmente influenciada por la temperatura, pudiéndose determinar que las condiciones óptimas se situaron entorno a los 15-17 °C para el control tanto de *F. verticillioides* como de *M. plumbeus*. Respecto a la a_w , los modelos predijeron que 0,97 es el valor óptimo para estas levaduras para el control de *M. plumbeus* y 0,84-0,87 para *F. verticillioides*, aunque sólo una de las 5 cepas presentó influencia significativa de este parámetro. Respecto al pH, los valores óptimos se encontraron entre 4,5 y 5,5 en función de la cepa, aunque este parámetro no influyó significativamente en la actividad. Las cepas de *K. lactis* presentaron un comportamiento menos uniforme que *P. jadinii*. De las 7 cepas evaluados, 2 se vieron influenciadas por la temperatura y 1 por la a_w en cuanto a sus actividades antagonistas frente a *M. plumbeus*, mientras que para el control de *F. verticillioides* sólo una cepa se vio afectado por la a_w . Las temperaturas óptimas de actuación predichas se situaron en valores cercanos a 10°C, con actividades de agua dispares entre cepas (0,84 para KL371 y 0,97 para KL1507). Finalmente, las dos cepas de *K. marxianus* evaluadas presentaron diferencias en cuanto a la influencia de los factores, en función del moho diana, con temperaturas óptimas de actuación de 8 °C, a_w de 0,84 y pH de 4,8. Es interesante seleccionar cepas que presenten actividades antagonistas estables en los rangos de condiciones físico-químicas que se dan durante la producción de los quesos (Sui *et al.*, 2015). En este sentido, la temperatura fue el factor más influyente, y con marcadas

Discusión

diferencias en cuanto a los óptimos de actuación en función de las especies. En cualquier caso, el origen de las cepas evaluadas en este trabajo garantiza una adecuada adaptación a la composición en nutrientes y condiciones ambientales de producción de los quesos.

Una vez caracterizadas las cepas de levaduras en base a su capacidad de controlar los mohos alterantes de quesos de pasta blanda, y determinar los espectros de actuación en base a las condiciones físico-químicas presentes en los quesos, se procedió a la evaluación de los mecanismos de acción, que como señalan Spadaro y Droby (2016) es esencial para el desarrollo de las formulaciones y los métodos de aplicación de los antagonistas. El primero de los mecanismos evaluado fue la capacidad de producción de VOCs antifúngicos, empleando el método denominado como sistema de doble placa (Tejero *et al.*, 2021) o método boca a boca (Medina-Cordova *et al.*, 2016). Este mecanismo ha sido objeto de un interés creciente en los últimos años, y el número de trabajos en los que se identifican especies de levaduras y VOCs antifúngicos ha aumentado exponencialmente (Oufenspu *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022). En primer lugar, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la diferente sensibilidad de los mohos alterantes a estos compuestos, ya que *P. commune* no fue inhibido por ninguna de las cepas evaluadas, mientras que *M. plumbeus* presentó inhibición en 7 de las 15 confrontaciones, y *F. verticillioides* en 14 de las 15. Además, es relevante el hecho de que varias cepas de levaduras produjeron volátiles que incrementaron el diámetro de crecimiento de los mohos, especialmente de *Penicillium*. Los niveles de reducción alcanzaron aproximadamente el 20% para *M. plumbeus* y 50% para *F. verticillioides*. Las diferencias en las sensibilidades de los géneros y especies fúngicas a los VOCs es un hecho observado previamente (Calvo *et al.*, 2020).

El análisis de los compuestos volátiles producidos por levaduras productoras y no productoras de VOCs antifúngicos mostró una clara asociación de los compuestos feniletil alcohol, 1-butanol-3-metil propanoato, etileter y 2-feniletilacetato con las cepas que produjeron la mayor actividad. Estos compuestos han sido previamente asociados a la inhibición de mohos como *B. cinerea*, *A. flavus* y *A. niger* por levaduras del género *Hanseniaspora* aisladas de frutas (Tejero *et al.*, 2021; Ruiz-Moyano *et al.*, 2020). Cepas de *K. marxianus* han mostrado su capacidad de producir VOCs antifúngicos (Alasmar *et al.*, 2020). Asimismo, Van Mullen *et al.* (2022) han demostrado la alta capacidad de cepas de *P. jadinii* y *K. lactis* de producir ésteres etílicos y fenetílicos. Además, la capacidad

antagonista de *P. jadinii* frente a mohos toxigénicos del género *Aspergillus* ha sido asociada a la producción de 2-feniletíl alcohol (Farbo *et al.*, 2018). Los trabajos relacionados con la identificación de VOCs antifúngicos producidos por levaduras aisladas de quesos han mostrado la producción de isoamil alcohol, isoamil acetato y feniletíl alcohol por *Candida maltosa* efectivos en el control de *Aspergillus brasiliensis* (Ando *et al.*, 2012), y la inhibición de *Cladosporium inversicolor*, *Cladosporium sinuosum*, *Fusarium avenaceum*, *Mucor racemosus*, y *P. roqueforti* asociado a la producción de acetona, ácido acético, ácido 3-metilbutanoico y 2-feniletíl alcohol por *D. hansenii* (Huang *et al.*, 2021).

La inhibición de la germinación de los conidios es una de las características más deseables de las levaduras antagonistas ya que pueden detener o al menos retrasar el desarrollo de los micelios y con ello la aparición de las alteraciones. Este efecto inhibitorio no es un mecanismo en sí mismo de inhibición, si no que puede estar provocado por otros mecanismos de acción como la producción de VOCs, antibiosis o competición por nutrientes. De hecho, en este estudio se observó una alta correlación de los efectos de los VOCs de las levaduras con la germinación de los conidios de *P. commune*, favoreciendo en gran medida el desarrollo de este moho. Por otro lado, Galván *et al.* (2022) demostró el potente efecto de los compuestos 2-feniletíl alcohol y 2-feniletíl acetato en la reducción de las ratios de germinación y el tamaño del tubo germinativo de *A. flavus* y *A. niger*, lo que podría estar relacionado con la reducción de la germinación de *F. verticillioides* y *M. plumbeus*. Como se ha mencionado, otros mecanismos de acción pueden inducir la reducción de las ratios de germinación de los conidios, como se observó con *Candida oleophila* productora de enzimas líticas sobre *Penicillium digitatum* (Bar-Shimon *et al.*, 2004), y con *Torulaspora globosa* sobre *Colletotrichum sublineolum* asociado a la producción de toxinas killer y a la competencia por espacio y nutrientes (Rosa *et al.*, 2010).

Otro de los mecanismos asociados al antagonismo de levaduras sobre los mohos es la capacidad de adherirse y con ello parasitar las hifas de los mohos, hecho denominado micoparasitismo. Generalmente esta capacidad de las levaduras se asocia con la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular (Spadaro y Droby, 2016), que permite a las levaduras alimentarse de los mohos. Este mecanismo es uno de los menos conocidos y descritos en las levaduras antagonistas (Agirman *et al.*, 2023;

Discusión

Freimoser *et al.*, 2019). Siete de las 15 levaduras antagonistas evaluadas presentaron adhesión a las hifas de al menos uno de los 3 mohos estudiados. Los resultados mostraron que la capacidad de adhesión a las hifas depende de la cepa, ya que se encontraron aislados de *P. jadinii* sin capacidad de adhesión (PJ659), con capacidad de adhesión a un moho (PJ173, PJ1008, PJ1469) y con capacidad de parasitar dos mohos (PJ433). Estos resultados mostraron que la adhesión también es selectiva, corroborando los resultados observados por Ruiz-Moyano *et al.* (2016) en los que *M. pulcherrima* fue capaz de adherirse fuertemente a hifas de *C. cladosporioides*, pero no a *B. cinerea* o *M. laxa*.

La relación entre el micoparasitismo y la capacidad de hidrolizar la pared celular de los mohos se pudo observar tras el análisis *in vitro* de las actividades enzimáticas. La cepa *G. candidum* 663 con mayor capacidad de adhesión a los tres mohos evaluados presentó unas intensas actividades pectinasa y β -glucanasa *in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron que la ausencia de actividad quitinasa no es un aspecto esencial para posibilitar el parasitismo de las hifas tal y como se observó, ya que ninguna levadura fue quitinolítica. Este resultado contrasta con lo expuesto por Agirman *et al.* (2023) y Zajc *et al.* (2019) que señalan que la actividad quitinolítica es muy relevante para el control de los mohos ya que este polímero es esencial para la estructura de la pared celular de los mohos. Estos autores igualmente señalan que la actividad proteolítica es también un aspecto esencial para el micoparasitismo. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que los aislados de *K. lactis* presentaron actividades proteolíticas destacadas, y no fueron capaces de parasitar las hifas. En cuanto a la actividad β -glucanasa, se ha relacionado esta capacidad con la modificación de la pared celular, la capacidad de adhesión celular y la resistencia a las toxinas killler (Tsai *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013^b) ya que los glucanos son los principales constituyentes de la pared celular de los mohos. se obtuvieron resultados contradictorios, ya que aislados de *P. jadinii* con intensa actividad β -glucanasa no presentaron actividad parasítica como PJ659, mientras que otros aislados de *P. jadinii* con esa actividad enzimática parasitaron de forma clara las hifas de los mohos. Castoria *et al.* (1997) observó que no existió correlación entre la actividad β -glucanasa de *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus laurentii* con la capacidad antagonista sobre *B. cinerea*, como se ha observado en este trabajo con el aislado PJ659.

Otro de los mecanismos evaluados respecto a las cepas antagonistas seleccionados fue la capacidad de producir metabolitos tóxicos difusibles. En general, las levaduras no están caracterizadas por la producción de metabolitos secundarios antifúngicos (Freimoser *et al.*, 2019), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo en los que ninguno de las cepas produjo metabolitos tóxicos difusibles frente a los mohos estudiados. Si bien es cierto que se debe recordar la capacidad de ciertas levaduras de producir toxinas “killer” o mycocinas; estas toxinas generalmente ofrecen ventajas competitivas principalmente frente a otras levaduras (Liu *et al.*, 2015; Mannazzu *et al.*, 2019).

La capacidad de competir por espacio y nutrientes es una de las más deseables en microorganismos antagonistas. Además, es un hecho que todos los microorganismos compiten por espacio y nutrientes por lo que es el mecanismo de acción común (Wisniewski *et al.*, 2007). Respecto a la competencia por el espacio, la capacidad de colonizar eficientemente las superficies por parte de los agentes de biocontrol imposibilita o al menos dificulta la germinación de los conidios de los mohos alterantes y toxigénicos. La capacidad de formar biofilms reporta múltiples ventajas a los microorganismos que lo producen, tanto en la colonización y competencia por los espacios como por los nutrientes. En general se asocia la capacidad de formar biofilm por las levaduras con la capacidad de formar pseudohifas. Este mecanismo es considerado como muy deseable en el control biológico de frutas en la pre y postcosecha, ya que la rápida y eficaz colonización de las heridas y microfracturas en la epidermis de las frutas imposibilita la germinación de los conidios (Klein y Kupper, 2018; Pu *et al.*, 2014). En el caso de los quesos, la producción de biofilms por las levaduras sólo debe ser aconsejable en quesos en los que la superficie viscosa sea deseable como ocurre en los quesos tipo Livarot (Mounier *et al.*, 2008) y Reblochon de Savoie (Mariani *et al.*, 2007). Esta capacidad es heterogénea entre cepas y especies de levaduras. Entre las cepas evaluadas, solo una, de la especie *K. marxianus*, mostró una moderada capacidad de formar biofilm. En estudios previos similares, cepas de esta especie también han demostrado cierta capacidad de formar biofilm (Deali *et al.*, 2021; Kheireddine *et al.*, 2021)

Finalmente, el último de los mecanismos de biocontrol evaluado fue la competición por los microelementos esenciales Fe y Mn. La mayoría de los seres vivos sintetizan queladores de Fe para privar de este elemento a competidores, parásitos y

Discusión

patógenos (Barber y Elde, 2015). En el caso de los mecanismos antagonistas, la competición por Fe es una de las vías más efectivas para la inhibición de mohos (Freimoser *et al.*, 2019; Spadaro y Droby, 2016). Algunas levaduras sintetizan sideróforos específicos asociados a su antagonismo como fusarinina C en *A. pullulans* (Wang *et al.*, 2009) y pulcherrimina en *M. pulcherrima* (Gore-Lloyd *et al.*, 2019). En el presente trabajo las cepas de *K. lactis* (5 de los 6 seleccionados) presentaron relevantes capacidades de competir por Fe y Mn. Sin embargo, las escasas referencias a la acción biocontrol de esta especie indican que los mecanismos de control estuvieron asociados a la producción de VOCs (Taczman-Brückner *et al.*, 2005^a). Si bien es cierto que varios trabajos reflejan la esencialidad del Fe para la síntesis de esteroides (con demostrada actividad antifúngica) por el género *Kluyveromyces* (Hoffmann *et al.*, 2023; Löser *et al.*, 2012). Hasta la fecha la competición por el hierro ha centrado el análisis de la relevancia de los microelementos en el antagonismo. Sin embargo, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la competencia por Mn debe ser considerada para la caracterización de los mecanismos de acción antagonistas. La competición por Mn ha sido descrita recientemente como un mecanismo de biocontrol relevante en varias especies de lactobacilos frente a levaduras y mohos alterantes de leches fermentadas (Siedler *et al.*, 2020)

Una vez caracterizadas las actividades de las levaduras antagonista confrontadas con los mohos alterantes de quesos de pasta blanda, previamente al ensayo de confrontación en quesos se realizó una nueva selección de los aislados más interesantes. En este caso, los aislados seleccionados fueron:

- KL1351 con capacidad de inhibir a *F. verticillioides* mediante producción de VOCs, y reducción de la germinación de las esporas, y de inhibir a *M. plumbeus* mediante la reducción de la germinación de las esporas, competición por Fe y Mn además de presentar actividad proteolítica.
- KL1507 con capacidad de inhibir a *F. verticillioides* mediante producción de VOCs, de inhibir a *M. plumbeus* mediante la reducción de la germinación de las esporas, adherirse a las hifas de *P. commune* y con actividad proteolítica.
- PJ173 con capacidad de inhibir a *F. verticillioides* mediante la reducción de la germinación de las esporas, de inhibir a *M. plumbeus* mediante la reducción de la germinación de las esporas y adherirse a sus hifas, además de presentar actividad proteolítica y β -glucanasa.

- PJ433 con capacidad de inhibir a *F. verticillioides* mediante producción de VOCs, reducir la germinación de las esporas y parasitar sus hifas, de inhibir a *M. plumbeus* mediante la producción de VOCs y reducir la germinación de las esporas, parasitar las hifas de *P. commune* además de presentar actividad proteolítica y β -glucanasa.
- GC663 con capacidad de reducir la germinación de los conidios de *F. verticillioides* y *M. plumbeus*, parasitar a los 3 mohos, y con actividades pectinasa y β -glucanasa.

Como controles en los ensayos en cuñas de queso se incluyó una levadura sin actividad antagonista y natamicina como uno de los antifúngicos más empleados por las empresas queseras (De Oliveira *et al.*, 2007; Resa *et al.*, 2014). Los resultados mostraron que la natamicina es un conservante muy efectivo y con un amplio espectro ya que inhibió completamente el desarrollo de los 3 mohos. La efectividad de la natamicina radica en su capacidad de unirse al ergosterol, una importante componente de las membranas plasmáticas de los mohos (Van Leeuwen *et al.*, 2010). Por otro lado, se pudo observar que la aplicación de levaduras que a priori no presentaban características antagonistas no interfirió en el desarrollo de ninguno de los 3 mohos evaluados. Las referencias sobre la aplicación de levaduras antagonistas para la inhibición de mohos en quesos son escasas. Liu y Tsao (2009^a) mostraron la capacidad de cepas de *D. hansenii* de inhibir el desarrollo de micelios de *Aspergillus* sp., *P. candidum*, *P. roqueforti*, *B. nivea* y *Cladosporium* sp. en trozos de queso. Fernández-Pacheco *et al.* (2022) propusieron cepas de *S. cerevisiae* y *Hanseniaspora osmophila* como potenciales candidatas para el control de mohos alterantes y toxigénicos en leches fermentadas como *A. niger*, *P. crustosum* y *Mucor fragilis*, pero la capacidad antagonista únicamente fue evaluada *in vitro*. En el presente trabajo, en cuanto a las cepas de levaduras antagonistas seleccionadas, se constató que *P. commune* presentó muy baja sensibilidad al control biológico, tal y como se había observado en las pruebas *in vitro*. Aun así, la cepa PJ433 fue capaz de reducir significativamente un 17% el desarrollo del micelio en las cuñas de queso. La bibliografía muestra algunos trabajos en los que cultivos puros y mixtos de BAL como *Lacticaseibacillus* spp. and *Lactiplantibacillus* spp. muestran actividad frente a *P. commune* en diversos quesos (Cheong *et al.*, 2014; Makki *et al.*, 2021); sin embargo, la bibliografía consultada no muestra esta capacidad en cepas de levaduras. En cuanto a *F. verticillioides*, 3 cepas redujeron significativamente su desarrollo en las cuñas de queso.

Discusión

Nuevamente el asilado PJ433 y los aislados KL1351 y KL1507 inhibieron entre un 15 y 30% el desarrollo del moho a los 11 días del ensayo. Los trabajos específicos para el control de este moho en quesos se han centrado en el uso de extractos vegetales y aceites esenciales como en el caso de los aceites esenciales de *Ocimum gratissimum* (Philippe *et al.*, 2012) con valores de concentración mínima inhibitoria superiores a 1000 mg/L. Finalmente, las cepas seleccionadas mostraron una mayor capacidad de controlar a *M. plumbeus* en las cuñas de queso, con porcentajes de inhibición que alcanzaron el 80% en el caso de GC663. Nuevamente la cepa PJ433 mostró una destacable capacidad de controlar a este moho, con porcentajes de inhibición cercanos al 50%.

En base a estos resultados, la cepa PJ433 presentó las mejores características para su utilización como cultivo bioprotectivo, puro o mixto con otras levaduras, frente a los principales mohos alterantes de quesos de leche cruda de oveja pasta blanda. Las propiedades tecnológicas de esta cepa han sido ya descritas por Merchán *et al.* (2022), la cual mostró unas adecuadas características para su implantación en quesos y potencial para contribuir positivamente al proceso de maduración. Lo cual hace indicar una adecuada implantación en los quesos en los que esta levadura sea aplicada como antagonista.

VII.5 Conclusiones

El cribado de la actividad antagonista en agar leche mostró que 15 cepas de levadura pertenecientes a las especies *P. jadinii*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *G. candidum* desarrollaron actividad antifúngica frente a dos mohos alterantes en quesos *M. plumbeus* y *F. verticillioides*. Sin embargo, ninguna levadura afectó de forma notable al crecimiento de *P. commune*. Además, se observó que la temperatura y, en menor medida, la actividad de agua (a_w) son cruciales en la actividad antifúngica de estas levaduras. Los mecanismos de acción asociados a la actividad antifúngica fueron variables según la especie y cepa. *K. lactis* destacó por su actividad proteolítica y competición por nutrientes. Interesantemente, *K. lactis* (KL804 y KL904) también mostraron inhibición mediante la producción de compuestos volátiles como feniletíl alcohol y 1-butanol-3-metil propionato. *G. candidum* GC663 destacó por su competición por el espacio asociada a su capacidad para parasitar las hifas y actividad pectinasa y β -glucanasa. Esta última actividad enzimática fue detectada en todas las cepas de *P. jadinii* en diferente rango, destacando entre ellas *P. jadinii* 433, la cual mostró también actividad proteolítica. Por último, en la evaluación *in vivo*, *G. candidum* GC663 y *P. jadinii* 433 controlaron parcialmente el crecimiento de *F. verticillioides* y *M. plumbeus*, sugiriendo su potencial como agentes de biocontrol alternativos a los aditivos químicos. Sin embargo, se requieren más estudios para entender completamente sus mecanismos de acción y estudios en quesos para confirmar su aplicabilidad en la producción industrial de quesos.

CAPÍTULO 4.

**LEVADURAS CON CAPACIDAD ANTAGONISTA
FRENTE A OTRAS LEVADURAS ALTERANTES Y
POTENCIALMENTE PATÓGENAS AISLADAS DE
QUESOS DE PASTA BLANDA.**

VIII. Capítulo 4. Levaduras con capacidad antagonista frente a otras levaduras alterantes y potencialmente patógenas aisladas de quesos de pasta blanda.

VIII.1 Resumen

Una de las levaduras alterantes que podemos encontrar en quesos de leche cruda es la especie *Yarrowia lipolytica*, esta levadura puede comprometer su apariencia por la producción de melanoidinas que dan lugar a coloraciones marrones rosadas, impactando negativamente en la percepción del consumidor. Dada la naturaleza restrictiva de los conservantes químicos permitidos en los alimentos, surge la necesidad de desarrollar estrategias de control biológico efectivas. Por ello, en este capítulo se aborda la necesidad de encontrar una levadura autóctona del queso que pudiera controlar la pigmentación de los quesos causada por la levadura *Y. lipolytica*.

La confrontación inicial de 112 levaduras aisladas de queso de pasta blanda contra 3 cepas de *Y. lipolytica* mostró actividad killer en cepas de 3 especies diferentes. La evaluación de las condiciones óptimas de pH, %NaCl y temperatura para la producción de toxina killer mostró perfiles variables en las condiciones óptimas de producción entre las especies positivas. *Debaryomyces hansenii* mostró en general mayor actividad a pH 4, 3-4% NaCl y 20°C, mientras que *Pichia jadinii* y *Kluyveromyces lactis* destacaron por su actividad a pH 5,5 y elevadas concentraciones de NaCl aunque divergieron en el factor temperatura. *K. lactis* mostró mayor actividad a 15°C mientras que *P. jadinii* destacó a temperaturas de 25-30 °C. El análisis de los resultados mediante un análisis de clúster jerárquico permitió seleccionar a *D. hansenii* DH1249. Además, también se seleccionó a la cepa *P. jadinii* PJ433 en base a su capacidad antagonista observada en este Tesis Doctoral. Ambas cepas junto con una levadura killer negativa, *D. hansenii* DH1206, fueron utilizadas para evaluar su capacidad de controlar a *Y. lipolytica* 918 (YL918) en un medio a base de leche suplementado con tirosina. La cepa PJ433 ralentizaba mínimamente la pigmentación, mientras que la cepa DH1249 disminuyó la pigmentación de manera notable. El estudio de la modelización de capacidad de las cepas DH1249 (Killer positiva) y DH1206 (Killer negativa) de controlar la pigmentación en las condiciones de maduración del queso mostró que las condiciones óptimas de pigmentación por parte de la cepa YL918 eran pH dependiente. En relación con la

Resumen

capacidad de inhibición DH1249, su actividad fue dependiente de la temperatura para la inhibición de la pigmentación. La cepa DH1206 mostró sorprendentemente una capacidad destacada de disminuir la pigmentación, lo que sugiere que otros mecanismos de actuación pueden estar implicados, como la competición por la tirosina. Como conclusión, la cepa DH1249 se presenta como una alternativa para disminuir la pigmentación causada por *Y. lipolytica* en la maduración del queso. Aunque se requieren más estudios, los hallazgos actuales establecen un fundamento sólido para investigaciones futuras.

VIII.2 Material biológico y diseño experimental

Las levaduras forman parte de la microbiota secundaria de los quesos de leche cruda y contribuyen a los procesos bioquímicos que definen sus características sensoriales finales. Las principales levaduras asociadas a los quesos de leche cruda de oveja de pasta blanda pertenecen a los géneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* y *Yarrowia* (Gonçalves *et al.*, 2017; Merchán *et al.*, 2022). El papel de estas levaduras es variable dependiendo la especie y cepa presente en el queso (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). Algunas especies de estos géneros han sido descritas como alterantes en quesos. Entre las principales alteraciones causadas por estas destacan la producción de sabores desagradables, formación de ojos, hinchazón temprana, la piel de sapo y la pigmentación marrón o rosada (Carreira *et al.*, 1998, 2002; Yalcin y Ucar, 2009; Garnier *et al.*, 2017; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). Estas alteraciones pueden ocasionar un aspecto desagradable y modificación de las características sensoriales del queso y por tanto rechazo del consumidor. Entre estos defectos, en los quesos de leche cruda de pasta blanda la aparición de coloraciones rosadas en el interior de la masa o en zonas cercanas a la corteza ha sido asociada a la actividad de la especie *Yarrowia lipolytica* (Carreira *et al.*, 1998; Merchán *et al.*, 2022). En la actualidad no existe en el sector quesero una estrategia de control para esta alteración, la cual cuando aparece causa importantes pérdidas económicas por el rechazo del producto por el consumidor (**Figura VIII.1**). Por lo tanto, es importante el desarrollo de estrategias antifúngicas para su control en la maduración del queso. Para ello en este capítulo planteamos el uso de levaduras autóctonas de queso con actividad killer frente a cepas de *Y. lipolytica* con capacidad de pigmentación. Inicialmente se evaluó la presencia de actividad killer y las condiciones óptimas de producción en un amplio número de levaduras y a continuación en un modelo experimental en agar leche se estudió la actividad de las levaduras killer positivas frente a *Y. lipolytica* en las condiciones de maduración de leche cruda de oveja de pasta blanda.

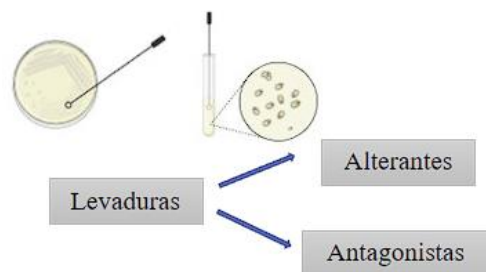


Figura VIII.1. Alteración de color rosada en queso de pasta blanda producida por *Yarrowia lipolytica*.

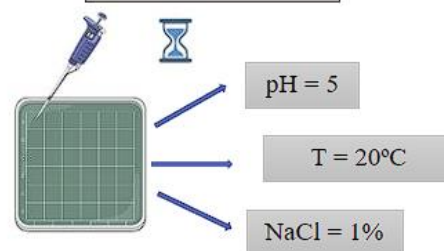
En la **Figura VIII.2** se muestra gráficamente el diseño experimental de este capítulo, donde se muestran los ensayos realizados.

1. Cribado de la actividad killer de las levaduras aisladas de queso

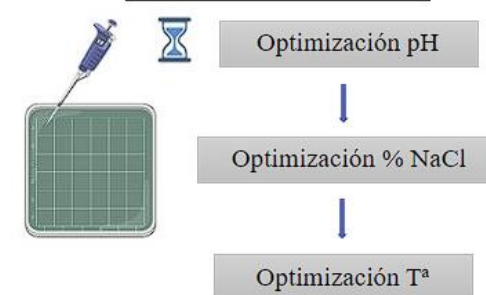
a. Cultivo de microorganismos y preparación de inóculos



b. Cribado de la actividad killer

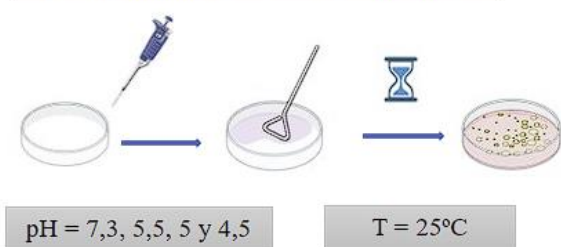


c. Producción óptima de la actividad killer

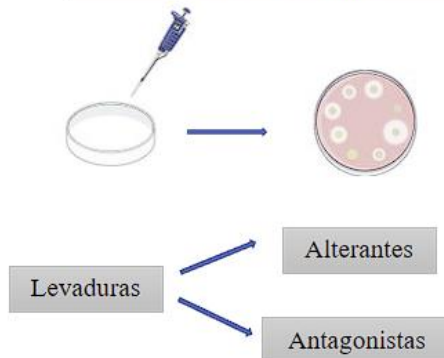


2. Evaluación del control de la pigmentación por *Y. lipolytica* en un modelo *in vitro* con agar leche

a. Condiciones óptimas de pH pigmentación en agar leche-tirosina



b. Control pigmentación en agar leche-tirosina



c. Modelización del impacto de las condiciones de maduración

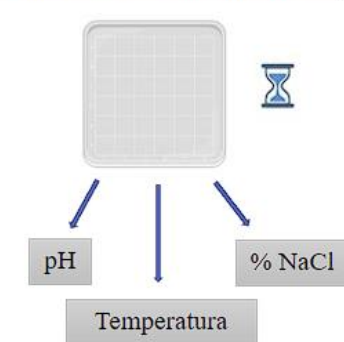


Figura VIII.2. Esquema general que se siguió durante el desarrollo de este capítulo (Elaboración propia)

Material biológico y diseño experimental

Un total de 115 levaduras fueron utilizados en este estudio (**Tabla VIII.1**). Entre ellas se incluyeron 112 levaduras aisladas de queso de pasta blanda de oveja y 3 cepas de *Y. lipolytica* con alta capacidad de pigmentación. Estas levaduras fueron aisladas e identificadas a nivel de cepa por Merchán *et al.* (2022). Además, de las levaduras autóctonas se utilizaron 5 cepas de referencia con fenotipo killer (Hernández *et al.*, 2008): *Saccharomyces cerevisiae* EX85 (Killer: K2; Regodón *et al.*, 1997); *Kluyveromyces lactis* (Killer: KL; Cedida por el profesor Dr. Ángel Domínguez, Universidad de Salamanca); *Hansenula mrakii/Williopsis saturnus* (Killer HM22; cedida por Dr. J.C. Ribas, Universidad de Salamanca); *S. cerevisiae* F166 (Killer: K1); *S. cerevisiae* F182 (Killer: K28).

Tabla VIII.1. Cepas de levaduras seleccionadas para el estudio de su actividad killer frente a cepas de levaduras de la especie *Y. lipolytica* con alta capacidad de pigmentación en queso (Merchán *et al.*, 2022).

Género	Especie	Nº de aislamientos	Código de cepa
<i>Candida</i>	<i>C. zeylanoides</i>	10	17, 330, 350, 665, 882, 896, 921, 925, 1214, 1459
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>	24	329, 353, 898, 910, 923, 933, 954, 1088, 1092, 1100, 1206, 1232, 1238, 1249, 1251, 1522, 1575, 1600, 1615, 1630, 1760, 1860, 2190, 2214
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i>	17	371, 874, 890, 904, 1098, 1351, 1507, 1528, 1542, 2141, 2146, 2267, 2287, 2478, 2554, 2561, 2725
	<i>K. marxianus</i>	12	364, 1070, 1463, 1518, 1540, 1730, 2144, 2154, 2459, 2469, 2484, 2744
<i>Pichia</i>	<i>P. fermentans</i>	9	170, 1076, 1364, 1438, 1520, 2143, 2472, 2497, 2720
	<i>P. jadinii</i>	8	173, 433, 659, 1008, 1468, 1544, 1731, 2489
	<i>P. kudriavzevii</i>	25	2, 165, 373, 435, 645, 871, 939, 1074, 1094, 1193, 1224, 1241, 1360, 1368, 1436, 1509, 1536, 1548, 1732, 1756, 2188, 2281, 2298, 2457, 2578
<i>Yarrowia</i>	<i>Y. alimentaria</i>	7	929, 1204, 1221, 1476, 1584, 1729, 2150
	<i>Y. lipolytica</i> ^{1*}	3	918, 1202, 2714
Total: 6	<i>Total: 10</i>	<i>Total: 115</i>	

¹Las cepas de levaduras marcadas en negrita son las utilizadas como diana en el estudio de la actividad killer de las cepas autóctonas de queso.

VIII.2.1 Cribado de la actividad killer de las levaduras aisladas de queso

VIII.2.1.1 Cultivo de microorganismos y preparación de inóculos

Para el cultivo de los microorganismos y la preparación de los inóculos se siguió el procedimiento descrito en el capítulo 1, apartado V.2.4.1.

VIII.2.1.2 Cribado de la actividad killer

El cribado inicial *in vitro* del fenotipo killer frente a cepas de *Y. lipolytica* se realizó con agar YEPD-MB (0,5% extracto de levadura (Condalab, Madrid, España), 1% peptona bacteriológica (Condalab), 2% glucosa (Scharlab, Barcelona, España), 1,5% agar bacteriológico (Condalab), 0,1 M citrato sódico (Scharlab) y 0,003% azul de metileno (Scharlab) suplementado con un 1% (p/v) de NaCl. Tras la disolución del medio en la cantidad adecuada de agua destilada, se calentó hasta ser llevado a ebullición. Posteriormente, se esterilizó a 121°C durante 16 minutos en autoclave y una vez atemperado a 50°C se ajustó el pH con ácido ortofosfórico (85%; Scharlab) de forma aséptica. Tras ajustar el pH se repartió aproximadamente 50 mL del medio en placas de Petri cuadradas de 12x12 cm.

La inoculación de las cepas diana de *Y. lipolytica* se realizó de forma individual en la superficie del agar YEPD-MB con un asa de digralsky utilizando 250 µL de una suspensión de 10^6 células/mL. Una vez que el medio absorbió la suspensión de la levadura diana, se inocularon 5 µL de la suspensión de 10^7 células/mL de cada una de las 117 levaduras utilizadas (112 levaduras aisladas de queso y las 5 cepas de referencia de fenotipo killer). Una vez inoculadas, las placas fueron incubadas a 20°C durante 96 horas, observando la presencia de halo de inhibición alrededor de las levaduras inoculadas cada 48 h horas (killer positiva) y midiendo el halo en mm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Aquellas levaduras que mostraron ser killer positivas fueron seleccionadas para estudiar las condiciones óptimas de pH, concentración de NaCl y temperatura de producción de la actividad.

VIII.2.1.3 Producción óptima de la actividad killer

La producción óptima del fenotipo killer a diferentes condiciones de pH, %NaCl y temperatura entre las levaduras positivas en el cribado inicial se evaluó en triplicado en agar YEPD-MB siguiendo la metodología general descrita anteriormente en el apartado VIII.2.1.2 de este capítulo. Las condiciones del medio de cultivo se ajustaron tal y como se describe a continuación:

1. *Optimización del pH*: se ajustó el pH del medio YEPD-MB asepticamente después de autoclavarse con ácido ortofosfórico (85%) a pH 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 y 6. Las placas una vez inoculada con las cepas diana y productora de la actividad se incubaron a 20 °C durante 7 días.
2. *Optimización del %NaCl*: una vez establecido el pH óptimo de producción del fenotipo killer por las levaduras seleccionadas se estudió el impacto de la concentración de NaCl. Para ello, el agar YEPD-MB ajustado al pH óptimo de producción de fenotipo killer fue suplementado previamente a autoclavarse con 1, 2, 3 y 4 % (p/v) de NaCl. Las placas una vez inoculada con las cepas diana y productora de la actividad se incubaron a 20 °C durante 7 días.
3. *Optimización de la temperatura*: el agar YEPD-MB fue elaborado con las condiciones óptimas de pH y % de NaCl de producción del fenotipo killer por cada levadura. Posteriormente, una vez inoculadas las placas con las cepas diana y productora de la actividad se incubaron a 10, 15, 20, 25 y 30°C durante 7 días.

VIII.2.2 Evaluación del control de la pigmentación por *Y. lipolytica* en un modelo *in vitro* con agar leche

VIII.2.2.1 Condiciones óptimas de pH pigmentación en agar leche-tirosina

Para estudiar la capacidad de las levaduras con fenotipo killer positivo de controlar la pigmentación del queso por *Y. lipolytica*, en primer lugar, se evaluó el impacto del pH en la capacidad de pigmentación de esta levadura en un medio modelo de agar leche. El agar leche modificado se preparó disolviendo leche desnatada en polvo (50 g/L; PanReac, Barcelona, España), NaCl (25 g/L; Scharlab), tirosina (10 g/L; Scharlab) y agar bacteriológico (15 g/L; Condalab) en agua destilada, y se esterilizó en autoclave durante 5 minutos a 115°C. El pH del medio fue ajustado asepticamente a pH 4,5 5, 5,5 y 7,3 (Control positivo) después de la esterilización y su enfriamiento a 50°C. Para ello, se

añadió de forma aséptica una solución esterilizada de ácido láctico al 10% (p/v) hasta alcanzar el pH deseado en el medio. A continuación, el medio fue repartido en placas de Petri de 90 mm y se dejó solidificar. Finalmente, se inocularon en superficie 100 μ L de una suspensión de 10^6 células/mL de la cepa *Y. lipolytica* 918 y se extendió de forma uniforme por la placa con un asa de digralsky. Las placas fueron incubadas a 25°C y observadas diariamente. El color de la superficie del agar se midió a los 7 y 12 días con un espectrofotómetro portátil CR-600d (Konica Minolta). Los resultados se expresaron en las coordenadas espaciales CIELab (Coordenadas: L*a*b*). L* indica la luminosidad (varía de 0 (blanco) a 100 (negro)), a* coordenadas rojo/verde (+a indica rojo (60); -a indica verde (-60), b* coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo (60), -b indica azul (-60).

VIII.2.2.2 Control pigmentación en agar leche-tirosina

La capacidad de las levaduras con fenotipo killer positivo de controlar la pigmentación del queso por *Y. lipolytica* se realizó en agar leche-tirosina. Para el ensayo se seleccionó una cepa de cada especie con fenotipo killer positivo y una cepa de levadura negativa. El medio de cultivo fue preparado tal y como se describe en el apartado VIII.2.2.1 de este capítulo con pH ajustado a 5,5. Una vez solidificadas las placas de agar, se inocularon en superficie 100 μ L de una suspensión de 10^6 células/mL de la cepa *Y. lipolytica* 918 y se extendió de forma uniforme por la placa con un asa de digralsky. Una vez se secó la suspensión de la levadura inoculada, se realizaron de forma aséptica en seis puntos equidistantes de la placa de agar pocillos de 5 mm, utilizando una punta estéril de 1 mL. Los pocillos fueron rellenados con el mismo medio de cultivo en estado líquido (50 °C) conteniendo 10^7 células/mL de la levadura. En el ensayo se utilizaron cepas con fenotipo killer previamente seleccionadas en el cribado y una levadura sin fenotipo killer como control negativo. Además, como control se utilizaron placas con los pocillos rellenos con el medio sin inocular. Las placas fueron incubadas a 20 °C durante 12 días. Una vez aparecida la pigmentación, se determinó espectrofotométricamente la intensidad de la pigmentación a 400 nm. Para ello, se tomó ½ de la placa de agar y se disolvió con calor (80 °C) el agar con agua estéril en proporción 1/5 (p/v). Una vez disuelto el agar, se centrifugó en tubos de 1,5 mL la solución del medio a 10000 g y se evaluó la concentración del pigmento en el sobrenadante a 400 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando como blanco agua. La

Material biológico y diseño experimental

determinación se realizó en cada toma de muestras en tres placas diferentes. Los valores de absorbancia en los diferentes enfrentamientos y control de pigmentación se representaron gráficamente respecto al tiempo.

VIII.2.2.3 Modelización del impacto de las condiciones de maduración de quesos de leche de oveja de pasta blanda en el control de la pigmentación

Para realizar esta modelización, se aplicó un diseño experimental Box-Behnken (BBD) con los factores temperatura, concentración de NaCl y pH, para así investigar como afectaban estos factores de forma conjunta a la actividad de control de la pigmentación de las cepas seleccionadas de *D. hansenii* con fenotipo killer. Los valores se establecieron como muestra la **Tabla VIII.2**, para así englobar las condiciones del proceso de maduración de los quesos de pasta blanda "Torta del Casar" y "Queso de la Serena" (Martínez *et al.*, 2011). Para el ensayo se utilizó medio de agar leche al 5% (p/v) suplementado con tirosina al 1% (p/v). Este medio, además fue suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (**Tabla VIII.2**). El pH del medio fue también ajustado a 3 condiciones diferentes, con una solución de ácido láctico al 10% (p/v). Para evaluar la capacidad de control de la pigmentación, se añadieron 100 µL de una solución de *Y. lipolytica* 918 (10⁶ células/mL) en la superficie de las placas de agar y se extendieron uniformemente con asa de digralsky. Tras el secado, se reservaron placas inoculadas con *Y. lipolytica* 918 (control positivo de pigmentación) y en el resto se inocularon individualmente en superficie las cepas de *D. hansenii*, una fenotipo killer positivo (DH1249) y otra negativo (DH1206). En el agar se pipetearon 100 µL de la suspensión correspondiente de *D. hansenii* a 10⁶ células/mL y se extendieron uniformemente con asa de digralsky. Además, como control, en paralelo se prepararon placas del medio, sin inoculación de *Y. lipolytica* 918, con 100 µL de agua estéril y se extendió. Por lo tanto, se obtuvieron un total de cuatro combinaciones:

- Control positivo pigmentación: *Y. lipolytica* 918.
- Combinación 1: *Y. lipolytica* 918+ *D. hansenii* DH1249 (killer positiva).
- Combinación 2: *Y. lipolytica* 918+ *D. hansenii* DH1206 (killer negativa).
- Control negativo: agua estéril.

Las placas fueron incubadas a las temperaturas expuestas en la **Tabla VIII.2** durante 15 días. Una vez aparecida la pigmentación, se retiró la capa de levadura superficial y se midió diariamente los parámetros del color del CIELab (L^* , a^* , b^* y las coordenadas polares: h^* y C^* ; todas descritas en el capítulo 2, apartado VI.2.1.4.) en la superficie del agar utilizando un sistema VeriVide's DigiEye.

Tabla VIII.2. Condiciones empleadas de % de NaCl, temperatura y pH durante el ensayo de modelización.

BLOQUE	%NaCl	Temperatura	pH
1	1	13	5
2	1	19	6
3	1	19	4
4	1	25	5
5	2,5	13	6
6	2,5	25	4
7	2,5	25	6
8	2,5	13	4
9	2,5	19	5
10	2,5	19	5
11	2,5	19	5
12	4	25	5
13	4	19	6
14	4	13	5
15	4	19	4

VIII.2.3 Análisis estadístico de los resultados

Con el objetivo de clasificar las cepas de levadura en función de su actividad killer contra *Y. lipolytica* en diferentes condiciones de pH, %NaCl y temperatura, se llevó a cabo un análisis de conglomerado (Cluster) jerárquico usando como método la vinculación inter-grupos y la medida de intervalo la distancia euclídea al cuadrado jerárquico utilizando el programa SPSS para Windows, 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Para la modelización del impacto de las condiciones de maduración en el control de la pigmentación se aplicó un diseño Box-Behnken de 3 niveles y 3 factores con 15 ejecuciones experimentales por bloque (12 en puntos factoriales y 3 en el centro)

Material biológico y diseño experimental

combinado con el método de respuesta de superficie para determinar los efectos de las condiciones de maduración (pH, temperatura y % NaCl) sobre la actividad antagonista de las levaduras frente a *Y. lipolytica*. La metodología de respuesta superficial se realizó empleando el software StatGraphics Centurion XVI versión 8.0. El modelo cuadrático fue el siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

donde Y es la variable de respuesta (inversa a los diferentes componentes del espacio CIEL**C***h**) predicha por el modelo; β_0 es un valor de desfase; β_1 , β_2 y β_3 son los coeficientes de regresión para los términos principales (lineales); β_{11} , β_{22} y β_{33} son efectos cuadráticos; β_{12} , β_{13} y β_{23} son efectos de interacción; y X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes. El modelo se utilizó para estimar los diferentes componentes del espacio CIELab (L**C***h**) de las levaduras seleccionadas frente a *Y. lipolytica* en las condiciones de maduración de los quesos Torta del Casar y Queso de la Serena DOP. El software también generó un ANOVA, estableciendo la significación estadística al nivel de confianza del 95%. También se obtuvieron con el mismo programa estadístico los niveles óptimos de pigmentación por parte de *Y. lipolytica* y los valores óptimos de inhibición de las levaduras antagonistas de cada variable analizada.

VIII.3 Resultados

VIII.3.1 Cribado de la actividad killer de las levaduras aisladas de queso

VIII.3.1.1 Cribado de la actividad killer

En este estudio se investigó la capacidad de levaduras autóctonas de queso de pasta blanda de controlar el crecimiento de cepas de *Y. lipolytica* causantes de la pigmentación marrón rojiza en quesos de pasta blanda. Para ello, se realizó primeramente un ensayo en el que se enfrentaron 112 levaduras potencialmente antagonista frente a 3 cepas de *Y. lipolytica* (YL918, YL1202 y YL2714). En este ensayo se observó que las especies con mayor capacidad de controlar el crecimiento de las levaduras alterantes fueron *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia jadinii* y *Pichia kudriavzevii* (**Figura VIII.3**). Dentro de estas especies, destaca *D. hansenii*, donde la mayoría de las cepas mostraron actividad, exceptuando una cepa (DH1206). De estas cepas, casi un 60% de ellas mostraron la capacidad de formar un halo de entre 9-12 mm. En segundo lugar, destaca la especie *P. jadinii*, en la cual el 80% de las cepas mostró la capacidad de formar halo, ocasionando todas halos de 6-9 mm. Finalmente, un porcentaje reducido de cepas de la especie *P. kudriavzevii* mostraron actividad en el rango de 6-9 mm. Las cepas con actividad killer demostrada en estudios anteriores, *Hansenula mrakii*/*Williopsis saturnus* (Killer HM22 y *S. cerevisiae* F166 (Killer: K1) mostraron actividad en este ensayo en el que se observaron halos de 6-7 mm de radio.

Resultados

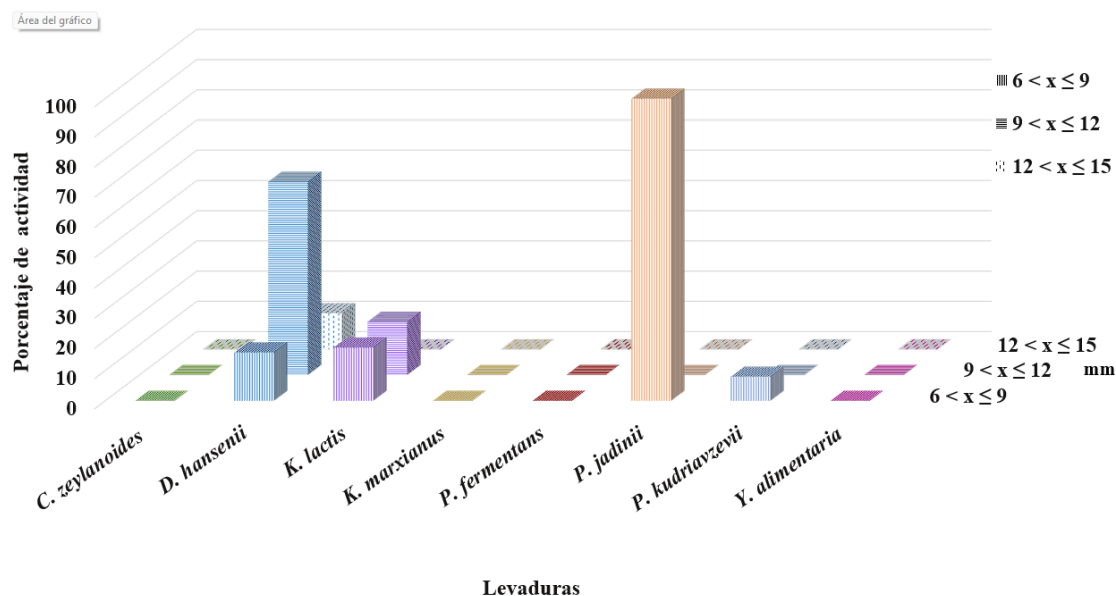


Figura VIII.3. Porcentajes de cepas de levaduras, clasificadas en 3 rangos, que presentaron halo frente a las cepas de *Yarrowia lipolytica* (YL918, YL1202 y YL2714). Se distingue por colores las distintas especies, en verde *Candida zeylanoides*, en azul oscuro *Debaryomyces hansenii*, en lila, *Kluyveromyces lactis*, en amarillo *K. marxianus*, en rojo *Pichia fermentans*, en naranja *Pichia jadinii*, en azul claro *Pichia kudriavzevii* y en rosa *Yarrowia alimentaria*. Se distingue por texturas rangos de halo de inhibición.

En base a estos resultados se realizó una selección de 12 levaduras de las 3 especies que mostraron mayor capacidad antagonista. Se seleccionaron 6 cepas de la especie *D. hansenii*, 5 con actividad antagonista (DH1232, DH1249, DH1760, DH1860, DH910 y DH933) y una sin actividad (DH1206). Se seleccionaron 3 cepas con capacidad antagonista de la especie *K. lactis* (KL1885, KL2478 y KL904) y por último 3 cepas de la especie *P. jadinii* (PJ1731, PJ 2489 y PJ433). Las cepas de la *P. kudriavzevii* con actividad no fueron seleccionadas ya que su halo fue de 6 mm de radio.

VIII.3.1.2 Producción óptima de la actividad killer

Una vez seleccionadas las levaduras, se realizó un ensayo para comprobar cuales eran las condiciones óptimas (dentro de las condiciones que se dan durante la maduración de los quesos) de pH, concentración de NaCl y temperatura en las que las levaduras mostraban la actividad killer frente a *Y. lipolytica*. En cuanto a los resultados de la actividad por especie (**Figura VIII.4**), se observó que las cepas pertenecientes a *D. hansenii* (**Figura VIII.4A**) fueron las levaduras con mayor actividad antagonista frente a las tres cepas de *Yarrowia lipolytica* (YL918, YL1202 y YL2714). Las otras dos especies

evaluadas, *P. jadinii* y *K. lactis*, mostraron claramente menor actividad a *D. hansenii*, aunque las cepas de *P. jadinii* (**Figura VIII.4B**) formaron en general halos de mayor tamaño que *K. lactis* (**Figura VIII.4C**). Las cepas de *D. hansenii* mostraron mayor actividad a pH inferiores a 5 en unas condiciones de 1% NaCl y 20 °C, donde se evaluó su actividad frente a variaciones de pH (3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 y 6). Igualmente se observó que, a menor pH, mayor actividad a concentraciones variables de NaCl y temperatura. En cambio, las cepas de *P. jadinii* mostraron en esas mismas condiciones mayor actividad a pH superiores a 5. Sin embargo, en las cepas de *K. lactis* el pH influyó levemente en su capacidad de inhibir el crecimiento de *Y. lipolytica*. En base a estos resultados se determinó establecer los valores de pH en 4 y 5,5 para evaluar el impacto de la concentración de sal y temperatura.

Resultados

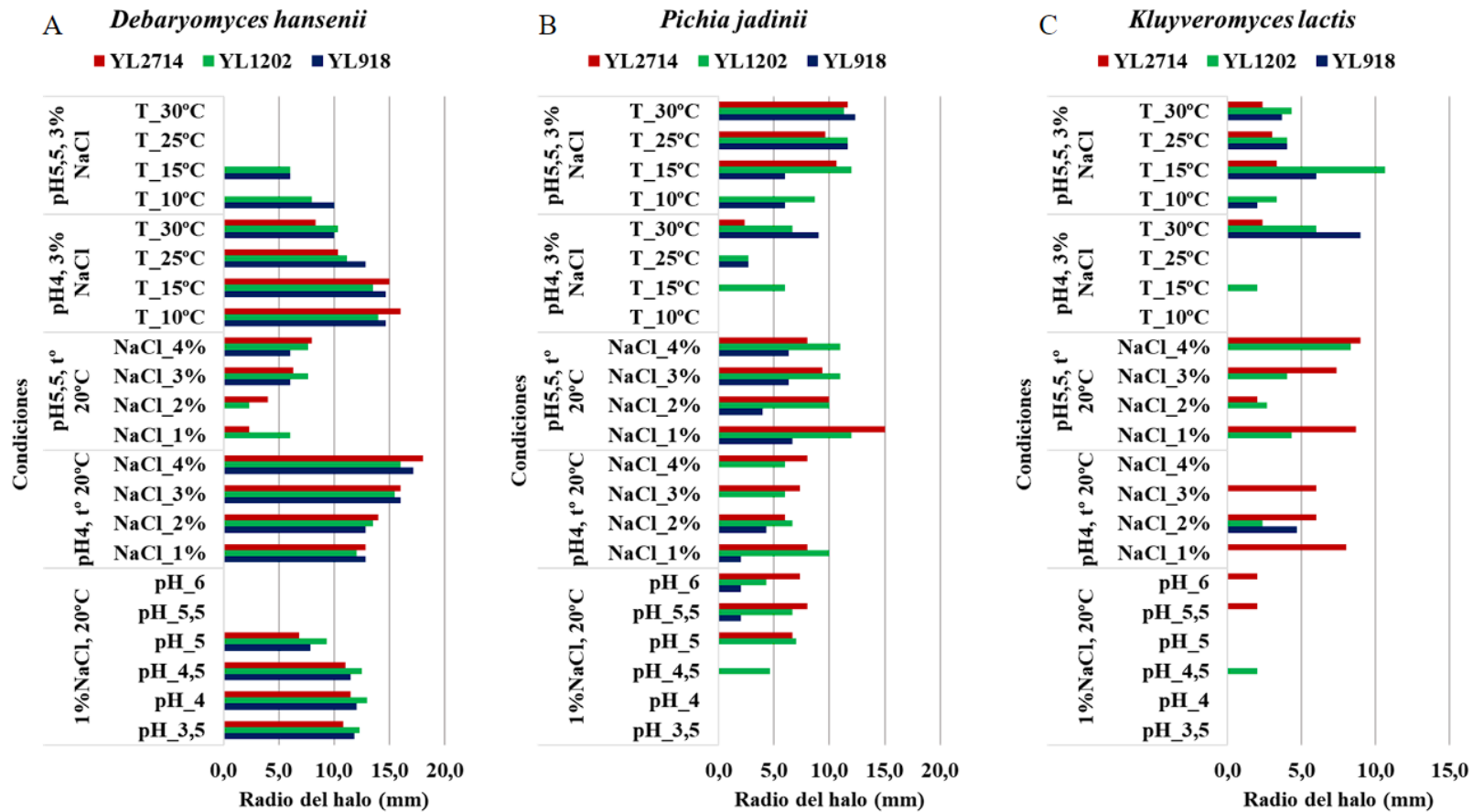


Figura VIII.4. Actividad antagonista (mm de halo) de las especies seleccionadas (A) *Debaryomyces hansenii*, (B) *Pichia jadinii*, y (C) *Kluyveromyces lactis* frente a las levaduras alterantes *Yarrowia lipolytica* (YL918 en azul, YL1202 en verde, y YL2714 en rojo) en las diferentes condiciones de pH, concentración de NaCl y temperatura.

Una vez se evaluó la influencia del pH en la actividad, se investigó su capacidad killer frente a *Y. lipolytica* a diferentes concentraciones de NaCl (1, 2, 3 y 4% de NaCl). Por tanto, las condiciones de los otros parámetros fueron 20°C de temperatura, y pH de 4 y 5,5. En relación con el pH 4, también se observó diferencias entre las especies. El comportamiento de *D. hansenii* (**Figura VIII.4A**) mostró que cuanto mayor era la concentración de NaCl, mayor era la actividad killer. La misma tendencia se observó para esta especie a pH 5,5 pero con menor tamaño de los halos. Contrariamente, *P. jadinii* resultó tener una mayor actividad killer en la menor concentración de NaCl evaluada, 1% (**Figura VIII.4B**), mostrando una actividad similar en las otras tres concentraciones de NaCl evaluadas a pH 4. De manera similar ocurrió a pH 5,5, aunque hay que destacar que la capacidad de formar halos fue mayor a este pH. En cuanto a *K. lactis* (**Figura VIII.4C**), se observó que a pH 4 menores concentraciones de NaCl favorecían la actividad killer; sin embargo, a pH 5,5, los halos de mayor tamaño se observaron a concentración de 1 y 4 %. En base a estos resultados, la concentración de NaCl óptima seleccionada para evaluar el impacto de la temperatura en la actividad killer frente a *Y. lipolytica* fue 3% de NaCl.

Por último, se evaluó la capacidad killer de estas tres especies a diferentes temperaturas (10, 15, 25 y 30°C) a dos pH diferentes (4 y 5,5) y una concentración de NaCl del 3%. Los resultados obtenidos en el ensayo mostraron, una vez más, la capacidad de control de las cepas de *D. hansenii* a pH 4, siendo mayor su actividad cuanto menor era la temperatura, al igual que ocurrió a pH 5,5 (**Figura VIII.4A**). Sin embargo, *P. jadinii*, mostró una capacidad mayor a pH 5,5 y temperaturas elevadas de 25 y 30°C (**Figura VIII.4B**). Finalmente, *K. lactis* presentó una mayor capacidad de formar halo a pH 5,5, siendo la temperatura de 15 °C su óptimo de actividad (**Figura VIII.4C**).

Además, estos resultados se analizaron mediante un agrupamiento mostrado en un dendograma en función de la actividad de las cepas. Los resultados mostraron dos agrupamientos claramente diferenciados (**Figura VIII.5**). Un grupo se conformó con todas las cepas de la especie *D. hansenii* (DH1232, DH1249, DH1760, DH1860, DH910 y DH933) y en el otro grupo las otras dos especies seleccionadas *K. lactis* (KL1885, KL2478 y KL904) y *P. jadinii* (PJ1731, PJ 2489 y PJ433), que a su vez se divide en dos subgrupos por especie. Por lo tanto, el agrupamiento en base a la actividad killer frente a *Y. lipolytica* era dependiente de la especie.

Resultados

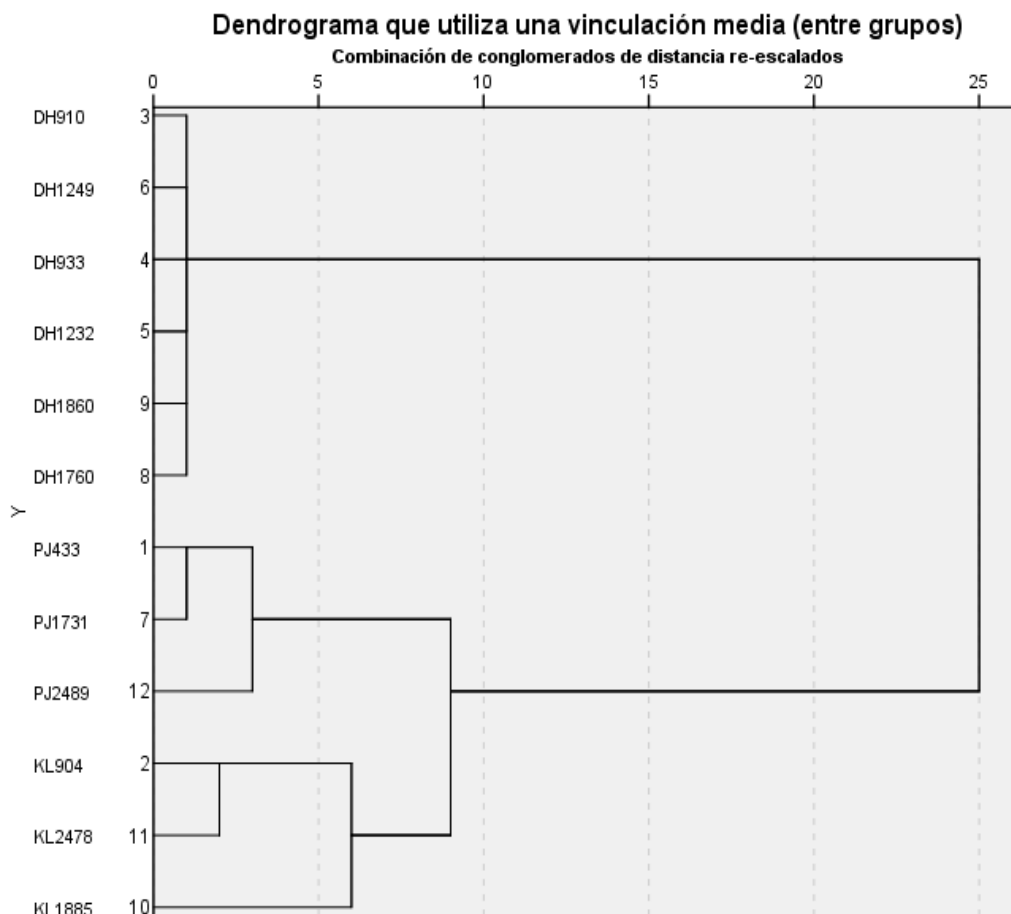


Figura VIII.5. Análisis de clúster jerárquico de los datos de inhibición del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* (YL918, YL1202 y YL2714) por las cepas de DH (*Debaryomyces hansenii*), PJ (*Pichia jadinii*) y KL (*Kluyveromyces lactis*) en las condiciones de pH, NaCl y temperatura ensayadas.

Como se puede observar en la **Figura VIII.5**, las cepas pertenecientes a la especie *D. hansenii* (DH1232, DH1249, DH1760, DH1860, DH910 y DH933) representan el grupo con mayor actividad. En base a esto se determinó hacer una comparativa de las cepas de *D. hansenii*, como se muestra en la **Figura VIII.6**. Estas cepas se dividen en dos grandes grupos: por un lado, las cepas DH1249 y DH910, identificado como grupo 1, con mayor actividad dentro de esta especie; por otro lado, el grupo 2, con una menor capacidad killer dentro de la especie *D. hansenii*, al que pertenecen las cepas DH933, DH1232, DH1860 y DH1760.

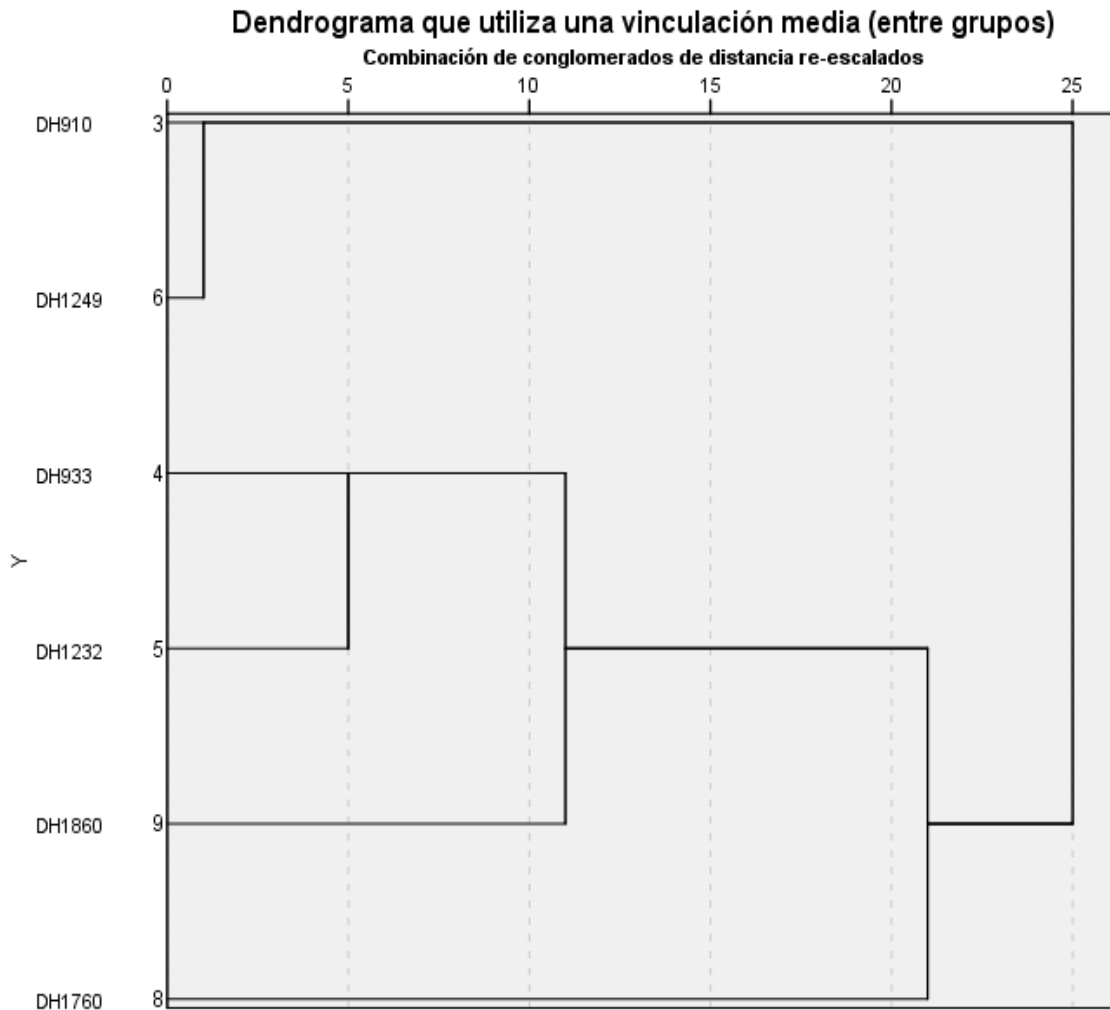


Figura VIII.6. Análisis de clúster jerárquico de los datos de inhibición del crecimiento de *Yarrowia lipolytica* alterantes (YL918, YL1202 y YL2714) por las cepas de DH (*Debaryomyces hansenii*) en las condiciones de pH, NaCl y temperatura ensayadas.

Una vez diferenciados estos dos grupos, se realizó una comparativa con el fin de poder seleccionar la levadura con mayor potencial killer frente a *Y. lipolytica*. Esta comparativa está representada en la **Figura VIII.7**, donde aparece reflejada las diferentes condiciones ensayadas y diferencias de la actividad de las cepas del grupo 1 y 2 de *D. hansenii*. El grupo 1 contiene las cepas DH1249 y DH910 (barras con valor negativo) y el grupo 2 las cepas DH933, DH1232, DH 1860 y DH 1760 (barras con valor positivo). El valor absoluto del tamaño de la barra muestra el grado de variación respecto a la media de los datos (eje central: 0).

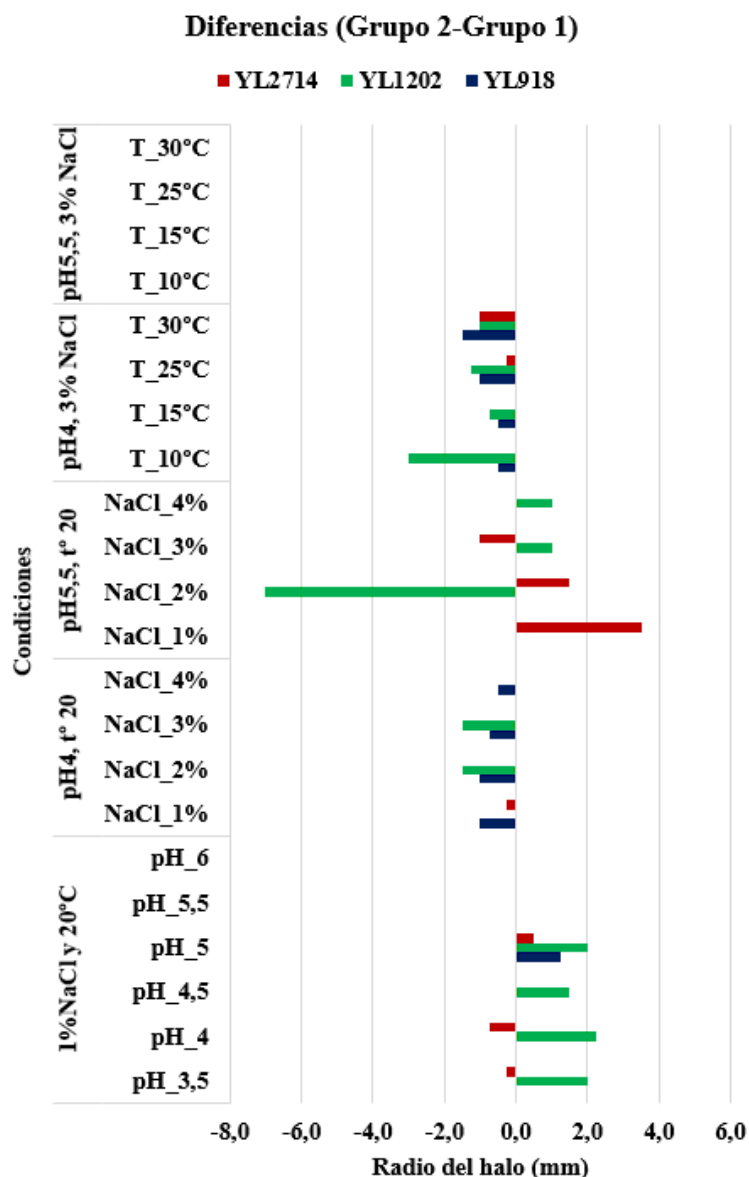


Figura VIII.7. Diferencial de actividad antagonista (mm de halo) del grupo 2 (cepas DH933, DH1232, DH1860 y DH 1760) menos el grupo 1 (cepas DH1249 y DH910) frente a las levaduras alterantes *Yarrowia lipolytica* (YL918 en azul, YL1202 en verde y YL2714 en rojo).

En la **Figura VIII.7** se puede observar cómo en general, las cepas del grupo 1 presentaron mayor capacidad de control de las cepas de *Y. lipolytica* en la mayoría de las condiciones ensayadas. Destaca en cuanto a formación de halo, la condición de pH5,5. 20°C y 2 % de concentración de NaCl frente a *Y. lipolytica* 1202. También hay que destacar que este grupo una mayor actividad frente a las 3 cepas de *Y. lipolytica*. Concretamente en las condiciones de pH 4, temperatura a 20° C y las 4 concentraciones de NaCl, así como en todas las temperaturas evaluadas a pH4 y 3% NaCl. Por otro lado,

las cepas del grupo 2 presentaron una mayor capacidad de control en las condiciones de pH 5,5 y 20°C en todas las concentraciones de NaCl frente a *Y. lipolytica* 1202 y *Y. lipolytica* 918. Del mismo modo, las cepas del grupo 2 destacaron en las condiciones de 1% NaCl y 20°C a diferentes pH.

En base a los resultados obtenidos en este capítulo y teniendo en cuenta lo observado en el capítulo 3 de este documento se seleccionaron las cepas *D. hansenii* 1249 y *P. jadinii* PJ433 para estudiar su capacidad de controlar la pigmentación causada por *Y. lipolytica* en un modelo de agar leche en las condiciones de maduración del queso. A modo de control se seleccionó una cepa sin actividad killer, *D. hansenii* 1206 (DH1206). Para estas dos cepas seleccionadas, los resultados mostraron que las condiciones óptimas de actividad killer fueron pH de 4 (DH1249) y de 5,5 (PJ433) en función de la cepa, a una temperatura de 20°C y con un óptimo de concentración de NaCl de 1% (PJ433) y 4% (DH1249).

VIII.3.2 Evaluación del control de la pigmentación por *Yarrowia lipolytica* en un modelo *in vitro* con agar leche

VIII.3.2.1 Condiciones óptimas de pH para la pigmentación en agar leche-tirosina

En este ensayo se evaluó la capacidad de la levadura alterante *Y. lipolytica* 918 de pigmentar un medio de agar leche suplementado con tirosina a diferentes pH dentro del rango que ocurre en la maduración del queso (4,5, 5 y 5,5), utilizando pH 7,3 como control positivo de pigmentación, para poder abordar el control de la pigmentación en las condiciones de actuación de las levaduras killer seleccionadas en los apartados anteriores. En la **Figura VIII.8** se muestra las imágenes y valores medios de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de las placas de agar leche suplementado con tirosina con pH ajustado en el rango de 4,5 a 7,3 e inoculadas con *Y. lipolytica* 918 a los 2, 7, 10 y 12 días de incubación. Los resultados obtenidos mostraron que, aunque más lentamente que el control positivo, *Y. lipolytica* 918 poseía la capacidad de pigmentar medios de base láctea suplementados con tirosina a pHs por debajo de su pH óptimo de pigmentación, confirmando además que, durante la maduración de queso, con pH ligeramente ácidos, la pigmentación puede ocurrir.

Resultados

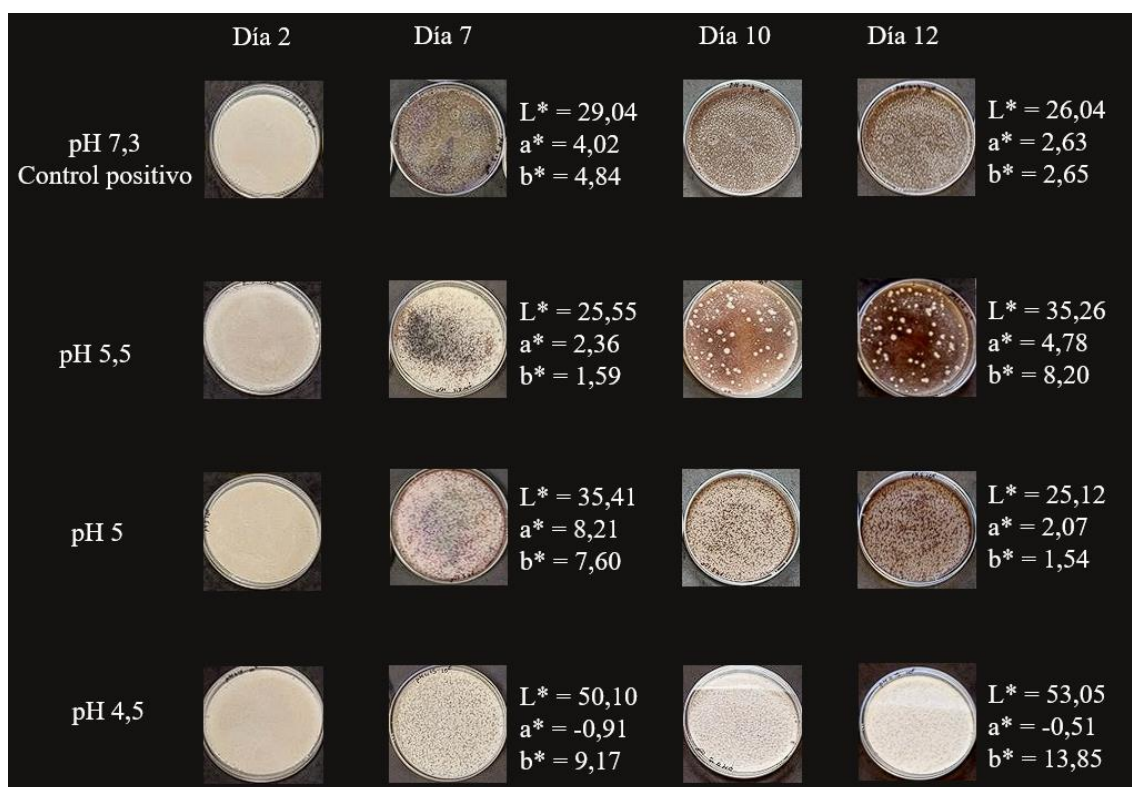


Figura VIII.8. Modificación del color (expresado en las coordenadas del espacio CIELab L* = luminosidad, a* = eje rojo-verde; b* = eje amarillo-azul) del medio agar leche tirosina durante 12 días inoculado con *Yarrowia lipolytica* 918.

VIII.3.2.2 Control pigmentación en agar leche-tirosina

Con el objetivo de evaluar la capacidad de levaduras killer positivas (*P. jadinii* PJ433 y *D. hansenii* DH1249) y negativa (*D. hansenii* DH1206) de controlar la pigmentación causada por *Y. lipolytica* 918 se iniciaron confrontaciones en medio de agar leche-tirosina a diferentes pH, en base al óptimo de actividad de las levaduras killer, midiéndose espectrofotométricamente la pigmentación durante 12 días. La evolución de la pigmentación de las confrontaciones se muestra en la **Figura VIII.9**.

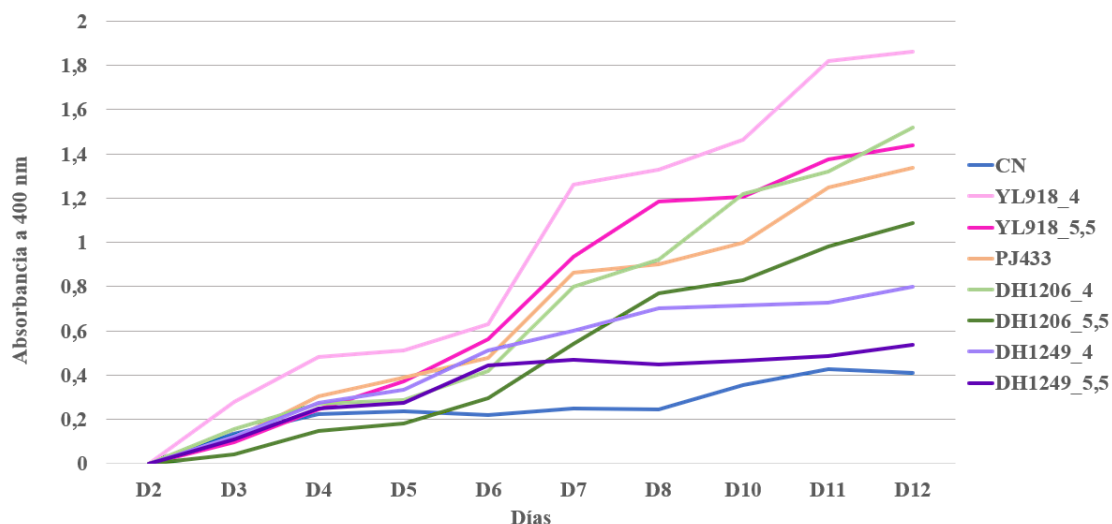


Figura VIII.9. Absorbancias del medio agar leche-tirosina inoculado con las levaduras seleccionadas frente a *Yarrowia lipolytica* 918 durante 12 días. Se distinguen las especies por color, en azul el control negativo, en rosa el control positivo (YL918 sin coinoculación), en naranja *Pichia jadinii* PJ433, en verde *Debaryomyces hansenii* DH1206 y en violeta *D. hansenii* DH1249. En color claro representado los resultados obtenidos a pH 4 y en oscuro a pH 5,5.

Como se puede observar en la **Figura VIII.9**, la cepa DH1249 consiguió detener de forma significativa la pigmentación del medio por parte de la levadura YL918, siendo más efectiva a pH 5,5 que a pH 4. En cambio, la cepa DH1206 (killer negativa), inhibió la pigmentación en menor medida que DH1249. En cuanto a la cepa PJ433 evaluada a pH 5,5, ralentizó de manera mínima la pigmentación causada por YL918. Por tanto, se seleccionaron las cepas pertenecientes a la especie *D. hansenii* para el siguiente ensayo, DH1249 como levadura killer positiva capaz de controlar la pigmentación y DH1206 como killer negativa, con el objetivo de evaluar si el fenotipo killer es el principal mecanismo de control de la pigmentación causada por *Y. lipolytica*, así como conocer como influyen las condiciones de maduración en el control de esta.

VIII.3.2.3 Modelización del impacto de las condiciones de maduración de quesos de leche de oveja de pasta blanda en el control de la pigmentación

Este ensayo se evaluó la capacidad de la cepa *D. hansenii* 1249 (DH1249) de controlar la pigmentación causada por *Y. lipolytica* 918 (YL918) en quesos de leche cruda. La cepa *D. hansenii* 1206 (DH1206) se utilizó como control negativo, al no presentar actividad killer. El modelo se diseñó considerando parámetros físico-químicos

Resultados

importantes en la maduración del queso, siguiendo un enfoque Box-Behnken (BBD) para analizar el impacto de la temperatura, concentración de NaCl y pH en la actividad de las levaduras.

La **Tabla VIII.3** presenta un análisis detallado de los atributos de color, específicamente la luminosidad (L^*), el croma (C^*) y el ángulo de matiz (h^*), en las cepas *Y. lipolytica* (YL918) y confrontaciones de cepas de *D. hansenii* (DH1249 y DH1206) y *Y. lipolytica* (YL918), durante 19 días de ensayo (D5, D7, D11, D13, D15, y D19). Se observan variaciones pronunciadas en estos parámetros a lo largo del tiempo. Por ejemplo, en el día 7, la cepa YL918, la luminosidad (L^*) presentó una media de 37,53, lo que indica una disminución notable en comparación con el día 5. Esta media viene acompañada de una desviación estándar (DS) de 18,41, reflejando una variabilidad considerable, con un rango que va desde 16,33 hasta 69,21. El croma (C^*) registró una media de 9,26 (DS: 4,54), mostrando una ligera disminución con respecto al día 5, y osciló entre 2,74 y 17,35. El ángulo de matiz (h^*) tuvo una media de 44,29, con una dispersión muy elevada (DS: 96,15), y su rango fue de 41,23 a 344,74, indicando cambios significativos en la tonalidad del color. En cuanto a las confrontaciones con *D. hansenii* (DH), tanto DH1206/YL918 como DH1249/YL918 también mostraron cambios en sus atributos de color en el día 7. DH1206/YL918 obtuvo una luminosidad media de 46,72 (DS: 17,86), con un rango de 14,15 a 66,36, y un croma medio de 11,15 (DS: 3,28), variando entre 5,10 y 17,58. Su ángulo de matiz fue de 54,91 en promedio (DS: 37,09), con un rango de 15,40 a 337,17. Por otro lado, DH1249/YL918 mostró una luminosidad media de 59,18 (DS: 14,19), un croma de 10,66 (DS: 2,90) y un ángulo de matiz de 86,98 (DS: 22,41), con rangos de 26,31 a 69,92, 3,25 a 15,54, y 31,80 a 110,10, respectivamente. Los datos obtenidos en los parámetros del color analizados en el día 7 en las diferentes combinaciones muestran una tendencia similar respecto a los observados en el día 5, aunque con algunas diferencias notables en los rangos y medias de cada parámetro. Los datos sugieren una ralentización en la pigmentación por *Y. lipolytica* YL918 por la actividad de las cepas de *D. hansenii* DH1249 y DH1206, siendo esta más acusada en el caso de DH1249. En general las confrontaciones con *D. hansenii* dio lugar a valores medios mayores de L^* , C^* y h^* , lo cual se traduce en una menor intensidad de pigmentación marrón rosada. Estos datos se ven reflejados en la **Figura VIII.10**, en las que muestran imágenes del ensayo en el día 7, respectivamente, con los 15 bloques de

condiciones físico-químicas y confrontaciones de cepas utilizadas para evaluar el control de la pigmentación por *D. hansenii*.

Resultados

Tabla VIII.3. Estadísticos descriptivos de los atributos del color, Luminosidad (L*) Croma (C*) y ángulo de matiz (h*) de la pigmentación por *Y. lipolytica* 918 (YL918) y las confrontaciones de *Debaryomyces hansenii*(DH) con YL918 (DH1206/YL918 y DH1249/YL918) en medio agar leche-tirosina a lo largo del ensayo.

Día del ensayo	Cepa	L*			C*			h*		
		Media ± DS ¹	Mínimo	Máximo	Media ± DS	Mínimo	Máximo	Media ± DS	Mínimo	Máximo
D5	YL918 ²	56,11 ± 14,18	22,47	72,35	10,28 ± 3,02	3,22	14,34	76,68 ± 26,59	26,23	111,91
	DH1206	59,97 ± 16,17	22,22	71,12	10,06 ± 4,40	3,68	17,96	90,97 ± 29,75	19,72	118,90
	DH1249	65,19 ± 8,81	48,08	72,91	9,95 ± 4,20	2,26	17,51	99,33 ± 17,33	61,00	123,69
D7	YL918	37,53 ± 18,41	16,33	69,21	9,26 ± 4,54	2,74	17,35	44,29 ± 96,15	41,23	344,74
	DH1206	46,72 ± 17,86	14,15	66,36	11,15 ± 3,28	5,10	17,58	54,91 ± 37,09	15,40	337,17
	DH1249	59,18 ± 14,19	26,31	69,92	10,66 ± 2,90	3,25	15,54	86,98 ± 22,41	31,80	110,10
D11	YL918	26,88 ± 12,68	16,93	63,12	8,62 ± 4,59	3,84	18,31	13,53 ± 62,49	21,69	345,26
	DH1206	32,12 ± 17,35	15,82	65,75	10,26 ± 4,14	5,37	20,19	43,48 ± 52,32	24,74	339,12
	DH1249	51,76 ± 15,60	21,55	68,69	11,98 ± 3,09	4,76	17,62	72,67 ± 30,76	14,49	133,63
D13	YL918	22,74 ± 6,84	15,99	42,25	7,85 ± 4,64	3,54	18,65	6,80 ± 64,56	22,17	342,84
	DH1206	29,90 ± 15,51	15,82	65,39	9,45 ± 4,32	5,35	20,20	32,75 ± 45,31	15,49	339,12
	DH1249	47,23 ± 16,16	21,77	71,37	12,49 ± 3,04	6,00	17,31	65,98 ± 28,83	18,88	113,77
D15	YL918	22,16 ± 6,54	15,35	41,78	7,34 ± 4,51	3,18	18,72	10,74 ± 52,63	16,68	344,24
	DH1206	30,73 ± 14,33	16,89	63,87	9,15 ± 5,42	4,31	22,65	36,67 ± 39,62	15,73	347,48
	DH1249	45,90 ± 16,10	21,79	71,15	12,11 ± 2,91	5,81	16,16	66,42 ± 28,92	21,42	115,01
D19	YL918	21,66 ± 3,49	16,69	30,14	6,42 ± 4,07	1,53	17,10	33,69 ± 22,18	18,13	354,15
	DH1206	28,59 ± 11,94	18,48	58,20	9,51 ± 5,42	3,19	19,73	47,47 ± 44,00	19,07	257,23
	DH1249	44,40 ± 17,15	21,84	72,37	13,50 ± 3,32	6,47	20,09	62,42 ± 24,26	28,83	98,39

¹DS= desviación estándar

² Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, YL918, *Yarrowia lipolytica*; DH, *Debaryomyces hansenii*. el número pertenece al código de cepa.

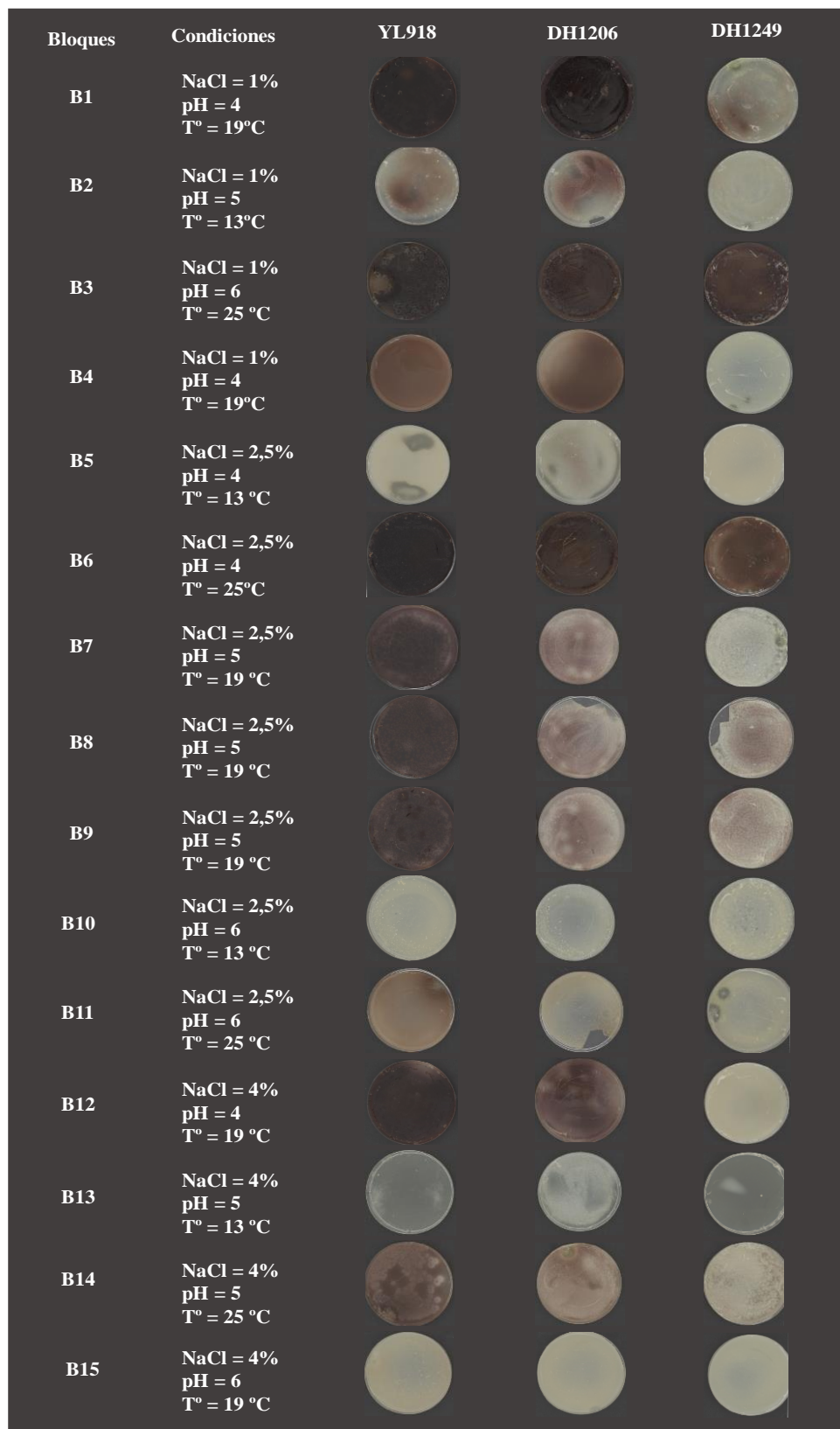


Figura VIII.10. Imagen de los diferentes bloques con sus condiciones de ensayo en medio de agar tirosina en el día 7 para las levaduras YL918, DH1206/YL918 y DH1249/YL918.

Resultados

A lo largo del ensayo la ralentización de la pigmentación por *Y. lipolytica* YL918 en presencia de *D. hansenii* se mantuvo. Así, en el día 15, la cepa *Y. lipolytica* YL918 mostró en las diferentes condiciones valores de parámetros del color asociados a un color marrón rosado más intenso. La luminosidad media fue de 22,16 (DS: 6,54), con un rango de 15,35 a 41,78, el croma medio fue de 7,34 (DS: 4,51), oscilando entre 3,18 y 18,72, y el ángulo de matiz promedió 10,74, con una variabilidad alta (DS: 52,63) y un rango de 16,68 a 344,24. En las confrontaciones con *D. hansenii* en el día 15, DH1206/YL918 mostró una luminosidad media de 30,73 (DS: 14,33), un croma de 9,15 (DS: 5,42) y un ángulo de matiz de 36,67 (DS: 39,62), con rangos de 16,89 a 63,87, 4,31 a 22,65, y 15,73 a 347,48, respectivamente. DH1249/YL918 registró una luminosidad media de 45,90 (DS: 16,10), un croma de 12,11 (DS: 2,91) y un ángulo de matiz de 66,42 (DS: 28,92), con rangos de 21,79 a 71,15, 5,81 a 16,16, y 21,42 a 115,01. Igualmente, a días anteriores de ensayo, estos valores sugieren una reducción progresiva y consistente en la intensidad del color marrón rosado causado por la *Y. lipolytica* YL918, siendo la reducción más evidente en el caso de la confrontación con la levadura *D. hansenii* DH1249. Estos datos se ven reflejados en la **Figura VIII.11** en las que muestran imágenes del ensayo a los 15 días mostrando imágenes de los 15 bloques de condiciones físico-químicas y confrontaciones de cepas utilizadas para evaluar el control de la pigmentación por *D. hansenii*. En los que se puede apreciar una clara ralentización de la pigmentación por parte de la cepa *D. hansenii* DH1249 (confrontación DH1249/YL918) con respecto al control YL918, mientras que en el caso de la confrontación DH1206/YL918 este efecto también ocurre; sin embargo, hay que destacar que la ralentización de la pigmentación fue más discreta por parte de esta última cepa.

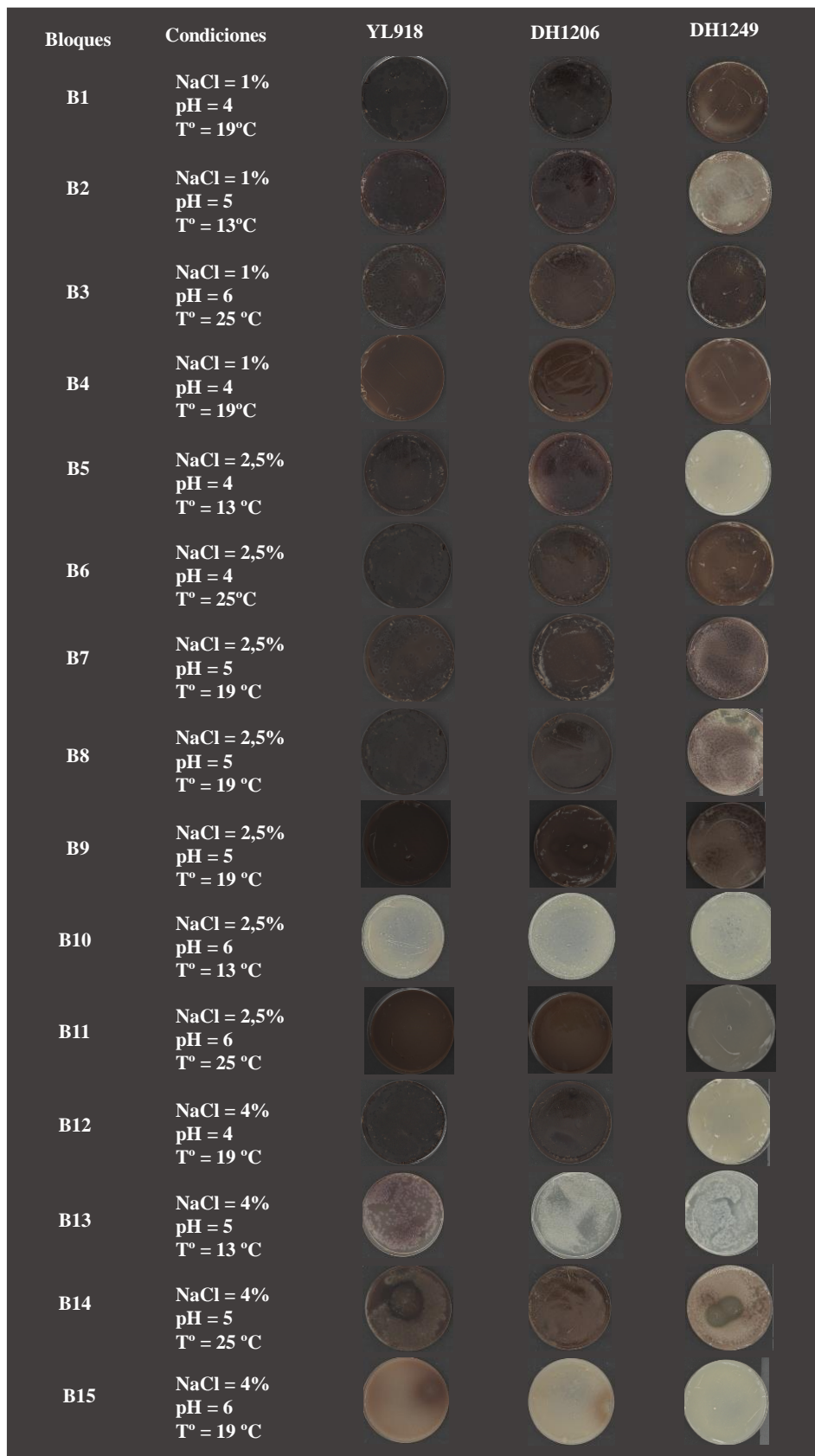


Figura VIII.10. Imagen de los diferentes bloques con sus condiciones de ensayo en medio de agar tirosina en el día 15 para las levaduras YL918, DH1206/YL918 y DH1249/YL918.

Resultados

Para el análisis cuadrático de superficie de respuesta, se evaluó por separado la capacidad de pigmentación de levadura YL918, enfocándonos en la optimización de la producción del pigmento, mientras que para las confrontaciones de las cepas DH1206/YL918 y DH1249/YL918 se centró en la optimización de los óptimos de inhibición, destacando así la necesidad de abordar cada cepa de manera individualizada debido a sus distintas características y objetivos específicos en el estudio. La **Tabla VIII.4** presenta el análisis ANOVA para un modelo cuadrático de superficie de respuesta, evaluando cómo la concentración de NaCl (A), la temperatura (B) y el pH (C) afectan a la pigmentación causada por la levadura *Y. lipolytica* (YL918) en los días D7 y D15 del ensayo. Los parámetros del color analizados: Luminosidad (L*), Cromo (C*) y ángulo de tono (h*).

Tabla VIII.4. Análisis ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, evaluando el efecto de la concentración de NaCl (A), temperatura (B) y pH (C) en la pigmentación (Luminosidad L*, Cromo C* y ángulo de tono h*) causada por la levadura *Y. lipolytica* YL918 en los días D7 y D15 de ensayo.

YL918 ¹						
Día del ensayo	D7			D15		
Componente	L*	C*	h*	L*	C*	h*
A: NaCl	0,042*	0,160	0,258	0,195	0,141	0,897
B: Temperatura	0,004*	0,719	0,297	0,475	0,265	0,036*
C: pH	0,012*	0,001**	0,084	0,015*	0,001**	0,024*
AA	0,484	0,423	0,988	0,578	0,992	0,519
AB	0,308	0,001**	0,082	0,307	0,248	0,770
AC	0,112	0,190	0,436	0,272	0,058	0,955
BB	0,011*	0,014*	0,255	0,347	0,071	0,620
BC	0,110	0,005*	0,464	0,074	0,226	0,329
CC	0,048*	0,002*	0,528	0,170	0,010*	0,724
ANOVA (<i>Estadísticos R²</i>)						
R²	94,10	97,36	75,82	84,77	94,11	80,51
R² ajustado	83,47	92,62	32,29	57,35	83,51	45,42
<i>Valores óptimos de pigmentación</i>						
A: NaCl	1,00	4,00	-	4,00	4,00	-
B: Temperatura	23,06	25,00	-	17,42	13,14	-
C: pH	4,60	5,99	-	4,00	6,00	-
Valor estimado	8,80	21,58	-	16,27	21,89	-

¹Las iniciales pertenecen a género y especie de la cepa, YL (*Yarrowia lipolytica*), el número pertenece al código de cepa * Los valores *p* inferiores a 0,050 son estadísticamente significativos (letra negrita). ** Los valores *p* inferiores a 0,001 son estadísticamente significativos (letra negrita).

En el día D7, se observa que tanto la temperatura como el pH tienen efectos estadísticamente significativos en la L*, con valores p de 0,004 y 0,012, respectivamente. La concentración de NaCl también influyó significativamente en la L*, con un valor p de 0,042. Las interacciones AB (NaCl/Temperatura) y BC (Temperatura/pH) tuvieron un impacto significativamente sobre el C* con valores de $p \leq 0,001$ y $\leq 0,005$, respectivamente, de la misma manera la interacción BC (Temperatura/pH). En los parámetros L* y C* la interacción cuadrática BB (Temperatura) impactó significativamente con valores de p de 0,011* y 0,014*, respectivamente, y el pH (CC) igualmente mostró una influencia cuadrática significativa en L* y C*, con valores de p de 0,048* y 0,002*. El modelo muestra altos valores de R² ajustado, indicando un buen ajuste del modelo a los datos (R² ajustado > 50). Para el día D7, los valores óptimos de pigmentación se encuentran a una concentración de NaCl de 1,00%, una temperatura de 23,06 °C y un pH de 4,60.

En cuanto al día D15, el pH influyó igualmente de forma significativa en la L* y el C* (valores p de 0,015 y 0,001, respectivamente) y también en el h* (p de 0,024). Además, este último componente también se vio afectado significativamente por la temperatura (valor p de 0,036). En cuanto a las interacciones lineales entre el % NaCl (A), temperatura (B) y pH (C) no mostraron efectos significativos en los distintos componentes. Las interacciones cuadráticas en este día también revelaron efectos limitados, particularmente la del pH (CC), que afectó significativamente al C*, con valor de p 0,010*. Por último, los valores óptimos que se observaron fueron, una concentración de NaCl de 4,00%, una temperatura de 17,42 °C y un pH de 4,00. Estos resultados demuestran cómo varían los parámetros óptimos para la pigmentación de YL918 en diferentes condiciones del ensayo a lo largo del tiempo.

En cuanto al análisis sobre las confrontaciones DH1206/YL918 y DH1249/YL918 respecto al control (YL918), en la **Tabla VIII.5** se muestra el análisis ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, enfocándose en la inhibición de la pigmentación mediante la evaluación de los parámetros del color (Luminosidad: L*; Cromo: C*; ángulo de tono: h*). Se examinó el impacto en la inhibición de las condiciones de NaCl (A), temperatura (B) y pH (C) en los días D7 y D15 del ensayo.

Resultados

Tabla VIII.5. Resultados ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, analizando la inhibición de la pigmentación (Parámetros del color: Luminosidad L*, Cromo C* y ángulo de tono h*) en las confrontaciones DH1206/YL918 y DH1249/YL918 bajo diferentes condiciones de NaCl (A), temperatura (B) y pH (C)

Cepa	DH1206 ¹						DH1249					
Día del ensayo	D7			D15			D7			D15		
Componente	L*	C*	h*	L*	C*	h*	L*	C*	h*	L*	C*	h*
A: NaCl	0,000**	0,300	0,550	0,006*	0,004*	0,001**	0,071	0,739	0,188	0,083	0,036*	0,050*
B: Temperatura	0,002*	0,199	0,496	0,013*	0,004*	0,000**	0,014*	0,222	0,028*	0,027*	0,061	0,025*
C: pH	0,000**	0,064	0,548	0,010*	0,000**	0,002*	0,032*	0,737	0,084	0,185	0,911	0,177
AA	0,004*	0,428	0,471	0,761	0,841	0,021*	0,325	0,686	0,418	0,819	0,389	0,887
AB	0,433	0,008*	0,847	0,022*	0,188	0,008*	0,005*	0,325	0,160	0,060	0,982	0,051
AC	0,230	0,060	0,068	0,500	0,009*	0,001**	0,407	0,945	0,519	0,677	0,211	0,716
BB	0,142	0,498	0,650	0,058	0,903	0,015*	0,034*	0,398	0,507	0,189	0,384	0,190
BC	0,009*	0,119	0,760	0,044*	0,148	0,012*	0,040*	0,437	0,173	0,214	0,780	0,455
CC	0,128	0,637	0,268	0,557	0,072	0,107	0,499	0,083	0,352	0,191	0,046*	0,094
<i>ANOVA (Estadísticos R²)</i>												
R ²	97,88	88,48	65,05	93,81	96,61	98,18	93,22	66,12	83,01	85,34	83,34	86,65
R ² ajustado	94,05	67,75	2,15	82,68	90,53	94,91	81,01	5,13	52,42	58,97	53,36	62,61
<i>Valores óptimos de inhibición de la pigmentación</i>												
A: NaCl	3,59	3,99		4,00	3,77	1,00	4,00	-	1,00	4,00	4,00	4,00
B: Temperatura	13,00	13,00		23,94	13,00	13,21	23,94	-	13,00	13,04	13,50	13,00
C: pH	5,37	5,98		6,00	4,00	4,00	6,00	-	5,98	4,00	5,32	4,00
Valor estimado	69,72	12,70		78,40	3,97	43,60	78,40	-	117,42	89,72	6,78	142,67

¹Las iniciales pertenecen a género y especie de las cepas, DH (*Debaryomyces hansenii*), el número pertenece al código de cepa * Los valores *p* inferiores a 0,050 son estadísticamente significativos (letra negrita). ** Los valores *p* inferiores a 0,001 son estadísticamente significativos (letra negrita).

Para la confrontación DH1206/YL918 en el día D7, se observa que la concentración NaCl (A) y pH (C) mostraron un efecto significativo en la luminosidad (L^*), con valores de p de 0,000 y 0,000, respectivamente. La temperatura (B) también fue significativa para L^* ($p \leq 0,050$). En cuanto a las interacciones lineales, concretamente AB (NaCl/Temperatura) afectó al C^* de manera significativa ($p \leq 0,050$), mientras al que la interacción BC (Temperatura/pH) fue significativa para L^* ($p \leq 0,050$). De la misma manera, atendiendo a las interacciones cuadráticas se observa que para L^* , la interacción AA (NaCl) también fue significativa ($p \leq 0,050$). No se observaron interacciones cuadráticas significativas para C^* y h^* . En el día D15, la concentración de NaCl, la temperatura y pH afectaron de manera significativa a los tres componentes, L^* , C^* y h^* ($p \leq 0,050$). En cuanto a las interacciones lineales, se observó como para L^* y h^* , AB (NaCl/temperatura) fue significativa ($p=0,022^*$ y 0,008, respectivamente), de la misma manera que la interacción AC (NaCl/pH) influyó significativamente en C^* y la BC (temperatura/pH) en el h^* ($p \leq 0,050$). En cuanto a las interacciones cuadráticas, se observa como las interacciones AA y BB fueron significativa para h^* ($p \leq 0,050$). No hubo interacciones cuadráticas significativas en L^* y C^* .

En cuanto a la confrontación DH1249/YL918, se observó como en el día 7, la temperatura influyó significativamente en la L^* y h^* y el pH influyó en la L^* ($p \leq 0,050$), mientras que el NaCl no afectó de forma significativa a ningún componente. En cuanto a las interacciones lineales AB (NaCl/temperatura) y BC (temperatura/pH) y la interacción cuadrática BB fueron significativas para L^* ($p \leq 0,050$), no se observaron otras interacciones lineales o cuadráticas para C^* y h^* . En relación con el día 15, el h^* fue afectado significativamente por NaCl y temperatura ($p \leq 0,050$). Además, el NaCl afectó significativamente al C^* y la temperatura a la L^* . En esta ocasión, las interacciones lineales no tuvieron ningún impacto significativo y las cuadráticas solo influyó significativamente la CC en el C^* ($p \leq 0,050$).

En la **Tabla VIII.5**, se muestra que el análisis realizado se ajusta bien a los factores y los rangos del modelo diseñado (R^2 ajustado > 50). Los valores óptimos de inhibición de la pigmentación varían entre las cepas y los días. En la confrontación DH1206/YL918, se observan valores óptimos en un amplio rango de concentraciones de NaCl, temperaturas y pH, dependiendo el parámetro del color utilizado como referencia. Por ejemplo, en el día D15, los valores óptimos para la inhibición de la pigmentación son

Resultados

una concentración de NaCl entre el 1-4%, una temperatura en el intervalo 13,00-23,94 °C y un pH de 4,00-6,00. Para la confrontación de DH1249/YL918, los valores óptimos de inhibición obtenidos a los 15 días son más estables entre los diferentes parámetros del color, con la excepción del óptimo de pH para el C*. Concretamente, esta confrontación mostró un óptimo de %NaCl de 4 y de aproximadamente 13°C en los tres parámetros del color, mientras que el pH óptimo fue de 4 en la L* y h* y de 5,32 en el caso del C*. Estos óptimos de inhibición de la cepa DH1249 están en general en concordancia con sus óptimos de actividad killer, la cual era mayor a pH de aproximadamente 4 y altas concentraciones de sal. Los datos obtenidos para ambas cepas de *D. hansenii* muestran variabilidad entre días de ensayo, condiciones y parámetros del color, destacando la complejidad y especificidad de las respuestas de estas cepas bajo diferentes condiciones experimentales.

En relación con los valores estimados de los parámetros del color (**Tabla VIII.4** y **Tabla VIII.5**), tomando como referencia los 15 días de ensayo, *Y. lipolytica* YL918 obtuvo unos valores de L* 16,27 y C* 21,89, el estimado del parámetro h* no se pudo obtener. En el caso de las confrontaciones DH1206/YL918 y DH/YL918 los valores fueron de L* 78,40 y 89,72, C* 3,97 y 6,78 y h* 43,6 y 142,67. Teniendo en cuenta la información que aportan los parámetros del color que se pudieron estimar en las tres confrontaciones, L* (Luminosidad) y C* (Croma o pureza del color), la L* es el parámetro que muestra de forma más clara cambios en la pigmentación del medio. Así, los valores estimados a los 15 días para el parámetro L* (valores más elevados en presencia de *D. hansenii*) corroboran la capacidad de *D. hansenii* de reducir la pigmentación causada por *Y. lipolytica* YL918, siendo este efecto más evidente en la cepa killer positiva, *D. hansenii* DH1249 (**Tabla VIII.4** y **Tabla VIII.5**).

VIII.4 Discusión

Tal y como se ha revisado en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, el desarrollo de diferentes especies de mohos en la superficie de los quesos supone una de las principales alteraciones en este tipo de productos. En este Capítulo 4 se pretende dar una solución con enfoque sostenible e innovador mediante la aplicación de biocontrol con levaduras antagonistas a otra de las principales alteraciones que sufren los quesos tradicionales de leche cruda, como son las pigmentaciones indeseadas de origen microbiológico, y en concreto a la pigmentación rosa-marrón de la pasta de los quesos blandos producida por *Y. lipolytica* (Carreira *et al.*, 1998).

Las pigmentaciones de los quesos de origen microbiano pueden ser deseables, como ocurre con los quesos blandos madurados amparados por las Denominación de Origen Protegidas (DOP) Vieux-Pané, Epoisses, Mont d'Or y Maroilles en los que *Brevibacterium linens* (Galaup *et al.*, 2007; 2015) y *Arthrobacter arilaitensis* (Giuffrida *et al.*, 2016; Sutthiwong *et al.*, 2021) producen carotenoides otorgando el característico color anaranjado-marrón. Sin embargo, en la industria quesera son varias las alteraciones asociadas a pigmentaciones de origen microbiológico que ocasionan importantes pérdidas económicas. Entre ellas, la más estudiada es la denominada pigmentación azul asociada al desarrollo de *Pseudomonas fluorescens* y otras *Pseudomonas* en quesos frescos (Carminati *et al.*, 2019; Carrascosa *et al.*, 2015, 2021; Martin *et al.*, 2011). *Pseudomonas* spp. puede producir diferentes pigmentos que pueden afectar la coloración de los quesos. La coloración azul está asociada al desarrollo de *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* y la producción de diversos pigmentos azules entre los que destaca el denominado piocianina (Cantoni *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2004). Las rutas de biosíntesis del triptófano y el metabolismo del hierro parecen estar relacionadas con la producción de los pigmentos (Andreani *et al.*, 2015). Estas alteraciones están asociadas a altos recuentos de determinadas cepas de *P. fluorescens* (superiores a 10^7 ufc/g). Además, la presencia de *Pseudomonas* está asociada a otros tipos de coloraciones (Cantoni *et al.*, 2003) ya que como informaron Meyer *et al.* (2002) miembros de *P. fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* tienen la capacidad de producir el pigmento fluorescente verde-amarillento denominado pioverdina. Además, en los últimos años se han identificado otros pigmentos asociados a las *Pseudomonas* que pueden tener implicación en las alteraciones en quesos como la piorubina, piomelanina e indigiodina

Discusión

(Chierici *et al.*, 2016; del Olmo *et al.*, 2018). Más allá de las *Pseudomonas*, otras bacterias como *Proteus* y *Psychrobacter* han sido asociadas a la producción de pigmentos como indigo e indirubina produciendo coloraciones púrpuras en la corteza de quesos madurados (Kamelamela *et al.*, 2018). Otra anomalía detectada en quesos DOP Fontina en la que aparecen coloraciones rojas-marrones parece estar asociada a la contaminación de los quesos por materiales de madera incorrectamente higienizados reservorios de Actinobacterias (Guzzon *et al.*, 2017).

También asociado al efecto bacteriano se han publicado casos de decoloraciones rosadas-marrones, como las producidas por *Bacillus* en queso Ricotta (Sattin *et al.*, 2016), *Propionibacterium* + *Lactobacillus*, y *Serratia liquefaciens* en Quesos Pecorino Toscano (Daghio *et al.*, 2022; Martinelli *et al.*, 2020), y *Thermus thermophilus* en quesos continentales (Quigley *et al.*, 2016), aunque las condiciones necesarias en estos casos continúan inciertas pero se ha asociado a la capacidad de producir pigmentos carotenoides y la presencia de cianocobalamina podría tener también cierta importancia. De hecho, en la revisión sobre la pigmentación rosada en quesos realizada por Daly *et al.* (2012) indicaron que la coloración rosa-marrón o marrón oscuro puede estar asociada a cepas termofílicas de lactobacilos y bacterias propiónicas, reacciones de Maillard, pigmentos microbianos (entre los que destacan carotenoides y compuestos fenólicos), entre otros factores. A pesar de que estos trabajos no mencionan el papel de las levaduras en la coloración rosada-marrón de los quesos, Carreira *et al.* (1998) denominaron pigmentación marrón a las descoloraciones observadas en la pasta de quesos de oveja portugueses, asociándolas a cepas de *Y. lipolytica* mediante el metabolismo de la tirosina y al efecto activador del Mn^{2+} . Posteriormente, Carreira *et al.* (2001; 2002) identificaron la producción extracelular de pigmentos marrones por *Y. lipolytica* en diferentes tipos de quesos como el camembert, así como Williams y Whitters (2007) en quesos del Reino Unido madurados por mohos. Se han identificado dos rutas principales para la producción de estos compuestos rosado-marrones (Apte *et al.*, 2013; Ben Tahar *et al.*, 2019). Estos pigmentos se producen cuando se acumulan en el medio distintos metabolitos intermedios a partir de la tirosina como el ácido 3, 4-dihidroxi-L-fenilalanina, ácido homogentísico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Carreira *et al.*, 2002), que se oxidan y polimerizan, conduciendo a la formación de piomelaninas y eumelaninas. Carreira *et al.* (2002) corroboraron la implicación del metabolismo de la tirosina en la producción del ácido homogentísico, y el papel del Mn^{2+} como acelerador de la reacción. A su vez, se demostró

que el ácido láctico aumenta el papel del Mn^{2+} . Posteriormente otros factores se han evaluado en el proceso de aparición de coloraciones marrones en quesos. Carreira *et al.* (2002) evaluaron la coinoculación de cepas de *Y. lipolytica* y cepas de distinta capacidad proteolítica de *Penicillium candidum* (una especie productora de coloraciones marrones a nivel superficial de los quesos). Asimismo, evaluaron la influencia de la adición de tirosina en los quesos. Los resultados demostraron que la adición de tirosina no influyó en la coloración, mientras que la proteólisis de las cepas de *Penicillium* si tuvo impacto en el aumento del color marrón. Además, sorprendentemente se encontró que el incremento en el inóculo de *Y. lipolytica* no incrementó la coloración marrón, posiblemente debido a la disminución de la proteólisis por competición con las cepas proteolíticas.

En esta Tesis Doctoral se ha podido constatar la aparición esporádica de coloraciones rosadas-marrones en el interior de quesos de pasta blanda en distintas queserías extremeñas, que suponen rechazos de los clientes y con ello unas pérdidas económicas y de imagen muy cuantiosas. La presencia de *Y. lipolytica* en estos casos podría ser la responsable de estas coloraciones al igual que en otros tipos de quesos en los que se ha asociado esta especie con estos tipos de defectos (Carreira *et al.*, 1998, 2002; Gardini *et al.*, 2006). Para el control de estas alteraciones se ha planteado en este trabajo el control biológico como estrategia para la resolución de este problema, investigando la capacidad de levaduras autóctonas de estos quesos con capacidad de controlar el desarrollo de esta coloración, interfiriendo en el crecimiento de *Y. lipolytica* o bien en la síntesis de los pigmentos.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de las levaduras autóctonas de controlar las cepas de *Y. lipolytica* mediante el cribado de la actividad killer. Esta estrategia ha sido previamente utilizada para el control de levaduras fermentadoras de galactosa como *S. cerevisiae* y *K. marxianus* en quesos elaborados a nivel de laboratorio empleando la levadura killer *Williopsis saturnus* (Liu y Tsao, 2009^b). La especie *D. hansenii* dominante en quesos presenta un amplio espectro de cepas con actividad killer frente a las levaduras patógenas humanas *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (Banjara *et al.*, 2016). El control de las levaduras patógenas se observó a pH inferiores a 6,5 y temperaturas inferiores a 35°C. En el trabajo de Zarowska *et al.* (2004) se evaluó la actividad killer de *Candida famata* y *Candida sphaerica* contra *Y. lipolytica*. Los resultados mostraron que

Discusión

dos de las tres cepas de *Y. lipolytica* fueron killer sensibles a *C. famata* y *C. sphaerica*, siendo los óptimos de actividad killer a pH 4,6, 14°C y 4% de NaCl. Los resultados del presente estudio han permitido identificar un número relevante de cepas autóctonas de quesos de pasta blanda de las especies *D. hansenii*, *K. lactis*, *P. jadinii* y *P. kudriavzevii* con capacidad de inhibir a cepas de *Y. lipolytica*.

Debaryomyces hansenii fue la especie que presentó mayor prevalencia de cepas killer, con únicamente una cepa sin actividad. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos en los que se ha caracterizado cepas de esta especie, las cuales presentan capacidad de controlar mohos y levaduras causantes de alteración en diversos alimentos como frutas, productos cárnicos, productos lácteos, etc. (Huang *et al.*, 2021; Medina-Córdova *et al.*, 2018). En concreto, Lessard *et al.* (2012) mostraron la efectividad de *D. hansenii* en el control de *K. lactis* en quesos de pasta blanda. Los mecanismos de acción antagonista de esta especie son amplios e incluyen la competición por espacio y nutrientes (Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Nally *et al.*, 2015; Nuñez *et al.*, 2015), el parasitismo directo asociado a la producción de enzimas líticas (Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Nally *et al.*, 2015) y la elevada capacidad de adhesión a la pared celular (Gil-Serna *et al.*, 2011; Gori *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2002), producción de VOCs antifúngicos (Nally *et al.*, 2015; Nuñez *et al.*, 2015), producción de metabolitos difusibles entre las que se encuentran las toxinas killer (Hernández-Montiel *et al.*, 2010; Nally *et al.*, 2015). De hecho, en los trabajos de Al-Qaysi *et al.* (2017), Çorbacı y Uçar (2017; 2018) y Marquina *et al.* (2001) han purificado y caracterizado las toxinas killer de esta especie, encontrando similitudes en cuanto que la efectividad de estas toxinas alcanza su óptimo a pH de 4,5 (desaparece a pH superiores a 5,5), se incrementa con la presencia de NaCl (óptimos entre 6-8%), y presentan temperaturas óptimas entre 20-25°C. Se ha constatado su acción inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida neoformans*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton concentricum*, y *Curvularia lunata*.

La proporción de cepas con actividad anti-*Yarrowia* mostró que *P. jadinii* fue la segunda especie con mayor prevalencia, aunque con una actividad menor a *D. hansenii*. La información bibliográfica acerca de la capacidad antifúngica de *P. jadinii* es relativamente escasa y tal y como ha sido revisada en el capítulo 3 se centra en la

capacidad de inhibir a levaduras patógenas humanas del género *Candida* (Buerth *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2014). Además, otros trabajos han señalado la capacidad de esta especie de producir toxinas killer frente a otras especies de *Pichia* como *P. fabianii*, *P. heimii*, *P. jadinii*, y *P. strasburgensis*, y *C. parapsilopsis* (Antunes y Aguiar, 2012; Mushtaq *et al.*, 2015). La capacidad antagonista de esta especie también ha sido relacionada con la producción de VOCs frente a diferentes especies de *Aspergillus* (Alkuwari *et al.*, 2022; Fiori *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2021).

Por su parte, la especie *K. lactis* presentó una prevalencia en el control de *Y. lipolytica* de alrededor del 20% de las cepas. La capacidad de producir toxinas killer de esta especie es conocida desde hace más de 30 años (Stark y Boyd, 1986; Wésolowski *et al.*, 1982). Esta toxina es activa frente a *Candida utilis*, *Dekkera bruxellensis*, *H. uvarum*, *Itsachenkia occidentalis*, *P. jadinii*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces paradoxus*, *Zygosaccharomyces bailii*, entre otras (Antunes y Aguiar, 2012). Además de la producción de toxinas killer, la competición por espacio y/o nutrientes fue el mecanismo de biocontrol de *K. lactis* sobre cepas toxigénicas de *Aspergillus* (Ghanbari *et al.*, 2019), mientras que la producción de VOCs sobre *P. expansum* (Taczman-Brückner *et al.*, 2005^b).

En base a los resultados obtenidos se realizó una preselección de 11 levaduras con capacidad de inhibir a las cepas de *Y. lipolytica* alterantes (Merchán *et al.*, 2022), además de incluir la cepa *D. hansenii* no killer para la determinación de las condiciones de producción de las toxinas killer durante la maduración de los quesos. Hay que tener en cuenta que se ha constatado que las pigmentaciones generalmente comienzan al principio de la maduración de los quesos (entre el día 8 y 12 según Carreira *et al.* (1998)), en el que las condiciones son ligeramente ácidas, las temperaturas son bajas al igual que la concentración de NaCl. No obstante, la pigmentación rosada puede avanzar durante la maduración en la que las condiciones de los quesos son cambiantes. El análisis de los factores potencialmente influyentes en la producción de las toxinas killer pH, concentración de NaCl y temperatura permitió determinar comportamientos diferenciados entre las cepas de las tres especies, y especialmente *D. hansenii* con las cepas seleccionadas de *K. lactis* y *P. jadinii*. Esto sugieren diferencias en el tipo de toxina o mecanismo de control asociado a las especies evaluadas más que a las cepas seleccionadas. La dependencia del pH en la actividad anti-*Yarrowia* de las cepas de *D.*

Discusión

hansenii están en consonancia con los hallazgos previos sobre las condiciones de actuación de estas proteínas (Çorbacı y Uçar, 2018); mientras que no existe información sobre la naturaleza y rangos físico-químicos efectivos de las toxinas de *P. jadinii*. La gran diversidad de toxinas killer identificadas y caracterizadas dentro del género *Pichia* complica la posible asimilación con especies taxonómicamente próximas (Belda *et al.*, 2017). Sin embargo, es sorprendente que la actividad anti-*Yarrowia* de *P. jadinii* se produzca a pH superiores a 5 y disminuya a bajas temperaturas, cuando la bibliografía señala como rasgo común de las toxinas killer su mayor efectividad a pH ácidos y bajas temperaturas (Belda *et al.*, 2017; Middelbeek *et al.*, 1979; Pfeiffer y Radler, 1984). El efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad de *D. hansenii* concuerda con el efecto general de la sal en la potenciación del efecto killer o en el aumento de la sensibilidad de las levaduras diana (Hernández *et al.*, 2008); sin embargo, este efecto no se observó en las cepas de las otras dos especies. Como se muestra en la **Figura VIII.5**, la acción inhibitoria de *D. hansenii* fue más consistente sobre las tres cepas de *Y. lipolytica* que las otras dos especies, especialmente comparando frente a *K. lactis* que presentó baja capacidad de actuación frente a *Y. lipolytica* YL918. En general, el ensayo de actividad en condiciones de pH, NaCl y temperatura asociados a la maduración del queso de pasta blanda mostró una mejor adecuación de las cepas de *D. hansenii* que las otras dos especies, y en concreto las cepas DH1249 y DH910 que presentaron halos mayores que el resto de las cepas de *D. hansenii* en la mayoría de las condiciones ensayadas. Tras estos ensayos, la cepa *D. hansenii* DH1249 fue seleccionada para el análisis de la capacidad del control de la pigmentación, al igual que las cepas *P. jadinii* PJ433 en base a las prometedoras capacidades antifúngicas observadas durante el capítulo 3 y el cribado inicial del capítulo 4.

Antes de comenzar los ensayos de control de la pigmentación en modelos *in vitro*, se evaluó la capacidad de *Y. lipolytica* de producir los pigmentos en las condiciones ácidas que se dan al inicio de la maduración de los quesos de pasta banda extremeños (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020; Roa *et al.*, 1999), ya que Carreira *et al.* (1998) ponen de manifiesto la basificación de los quesos que se produce durante la pigmentación. Estos autores, igualmente, pusieron de manifiesto, tras evaluar diferentes medios de cultivo y sustratos, que la suplementación con tirosina de los medios de cultivo contribuye a una más rápida pigmentación por parte de *Y. lipolytica*. Los resultados obtenidos permitieron determinar la capacidad de estas levaduras de producir los pigmentos a pH superiores a 5 en agar

leche-tirosina, que entrarían dentro del rango de actuación de las cepas de *D. hansenii* y *P. jadinii*. Además, se evaluó la influencia de tres factores como el pH, la concentración de NaCl y temperatura en la pigmentación dentro de los rangos que se dan durante la maduración de los quesos de pasta blanda. El pH fue el factor más influyente para la producción de la pigmentación coincidiendo con la observación de Carreira *et al.* (2002) en la que atribuye al ácido láctico el papel de potenciación de la activación de la pigmentación del Mn^{2+} . En el mismo sentido, Yann *et al.* (2005) determinaron que los factores esenciales para la aparición de la pigmentación rosada-marrón fueron la acidez, junto con la concentración del cuajo; pero contrariamente a los resultados obtenidos en este trabajo la temperatura también fue decisiva. Los valores óptimos de pH se situaron en 6, indicando que es a partir de la mitad de la maduración de los quesos cuando se darían las condiciones de pH más idóneas para la pigmentación (Crespo *et al.*, 2022; Delgado *et al.*, 2009; Ordiales *et al.*, 2013), aunque tal y como indican Carreira *et al.* (2001) la pigmentación se puede producir desde las etapas iniciales de la maduración. Por su parte, se pudo comprobar que los factores % de NaCl y temperatura no influyeron significativamente en la pigmentación, aunque se determinaron interacciones significativas entre los factores, especialmente al inicio de la pigmentación. Las condiciones óptimas para la pigmentación se situaron alrededor de los 25°C y con 4% de NaCl. Respecto a la influencia del NaCl, Williams y Whifers (2007) determinaron la reducción en la acumulación del ácido homogentísico, precursor de las piomelaninas, cuando se incrementó la salinidad del medio.

Tras esto, la observación espectrofotométrica a 400 nm (Carreira *et al.*, 2001) de la pigmentación del medio leche-tirosina en las confrontaciones entre levaduras killer positiva y *Y. lipolytica* YL918 permitió determinar la ineficacia de PJ433 para el control de la pigmentación. Estos resultados pueden deberse al cambio de medio de cultivo, en el que la cepa *P. jadinii* PJ433 puede no desarrollar la capacidad inhibitoria del mismo modo que en el medio YEPD-MB. Por su parte, se pudo comprobar la alta efectividad *in vitro* de la cepa *D. hansenii* DH1249 para inhibir la pigmentación de *Yarrowia* en el rango de pH de 4 a 5,5, y en menor medida de la cepa *D. hansenii* DH1206 (Killer negativa). El pH, tal y como se ha discutido anteriormente, es el factor más determinante para la síntesis de los pigmentos. Si bien estos pigmentos se pueden producir en todo el rango de maduración de los quesos (Crespo *et al.*, 2022; Delgado *et al.*, 2007; Ordiales *et al.*, 2014; Roa *et al.*, 1999), es deseable emplear cepas antagonistas con capacidad de inhibición en

Discusión

todo ese rango. En este sentido, el efecto del pH sobre la inhibición de la pigmentación por *D. hansenii* DH1249 no fue lineal, además de presentar interacciones significativas con la temperatura. Este último factor, la temperatura, tuvo una influencia significativa sobre la inhibición de la pigmentación, de tal manera que a temperaturas bajas (óptimo 13°C) la inhibición de la pigmentación fue más efectiva. Un aspecto sorprendente fue la capacidad moderada de inhibir la pigmentación de la cepa killer negativo (*D. hansenii* DH1206), que presentó dependencia estadísticamente muy significativa de la temperatura y significativa del pH para este efecto. Esto pone de manifiesto, que además del fenotipo killer, otros mecanismos pueden inhibir la pigmentación como podría ser la competición por la tirosina de las cepas de *D. hansenii*, lo cual debe ser estudiado en futuros estudios. En general, *D. hansenii* ha sido catalogada como de baja actividad tirosinasa (Nichol *et al.*, 1996); sin embargo, Van den Tempel y Jakobsen (2000) identificaron una cepa de *D. hansenii* con una elevada actividad enzimática, que podría contribuir a la competición por este nutriente con *Y. lipolytica*.

En este capítulo 4 se ha puesto de manifiesto que dentro de las especies de levaduras que de forma natural se encuentran en los quesos de pasta blanda extremeños existen una amplia variedad de cepas capaces de inhibir *in vitro* a las levaduras productoras de pigmentación *Y. lipolytica*. Sin embargo, la capacidad de inhibir a estas levaduras en medios de cultivo sintéticos no necesariamente conlleva la capacidad de inhibir la producción de la pigmentación tal y como ha ocurrido con la cepa PJ433 de *P. jadinii*. En sentido contrario, se ha podido observar como la cepa DH1206 de *D. hansenii*, sin capacidad inhibitoria killer, fue capaz de controlar la pigmentación por *Y. lipolytica* de forma moderada, por lo que otros mecanismos de inhibición de la pigmentación pueden estar involucrados. Finalmente, la cepa *D. hansenii* DH1249 presentó una elevada capacidad de controlar el desarrollo de las levaduras pigmentadoras, así como de controlar la producción de la pigmentación en modelos *in vitro*, siendo potencialmente efectiva en todas las condiciones de pH, temperatura y concentración de NaCl que se producen durante la maduración de los quesos de pasta blanda extremeños. En próximos ensayos elaborando quesos a escala piloto co-inoculando las cepas alterantes de *Y. lipolytica* y la cepa *D. hansenii* DH1249 se deberá validar la capacidad de esta levadura de controlar la pigmentación rosada-marrón que de forma recurrente ocasiona pérdidas económicas y de confianza de los clientes a las queseras productoras de tortas en la Comunidad Autónoma Extremeña.

VIII.5 Conclusiones

Yarrowia lipolytica, una levadura alterante en quesos compromete la apariencia del producto por su pigmentación, afectando a la percepción del consumidor. Ante las limitaciones en el uso de aditivos y la conveniencia de aplicar métodos de control biológico, se exploró la búsqueda de levaduras autóctonas del queso que controlen esta pigmentación. Se evaluaron 112 levaduras, de las que cepas de *Debaryomyces hansenii*, *Pichia jadinii*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia kudriavzevii* mostraron capacidad para controlar el crecimiento de *Y. lipolytica*. Los ensayos de optimización de las condiciones de actividad killer (pH, temperatura, NaCl) identificaron a las cepas de *P. jadinii* (PJ433) y *D. hansenii* (DH1249) como las más eficaces. Sin embargo, solo la cepa *D. hansenii* DH1249 demostró ser efectiva en ralentizar la pigmentación causada por *Y. lipolytica*. Además del control de la pigmentación por el antagonismo asociado al fenotipo killer, la cepa killer negativa *D. hansenii* DH1206 mostró cierta capacidad de limitar la pigmentación, este hallazgo evidencia que otros mecanismos están implicados, probablemente asociado a la competencia por nutrientes. Los resultados sugieren que la cepa *D. hansenii* 1249 es una alternativa prometedora para reducir la pigmentación durante la maduración del queso, aunque requieren estudios adicionales para una comprensión más completa y aplicación práctica en la industria.

CONCLUSIONES

IX. Conclusiones

1. Las cepas *Pichia kudriavzevii* L18 y *Zygoascus meyeri* L29 destacan como agentes de biocontrol eficaces contra *Penicillium glabrum* en uvas, utilizando mecanismos como la producción de compuestos orgánicos volátiles y enzimas líticas.
2. La combinación de atmosferas modificadas pasivas y las levaduras antagonistas, *Metschnikowia pulcherrima* L672 y *Pichia kudriavzevii* PK18, ofrece un control efectivo del deterioro microbiológico en cerezas, manteniendo calidad comparable a tratamientos fungicidas.
3. Las levaduras *Geotrichum candidum* GC663 y *Pichia jadinii* PJ433 presentan un elevado potencial para el control biológico de mohos alterantes de quesos.
4. La cepa *Debaryomyces hansenii* DH1249 se presenta como una solución prometedora para reducir la pigmentación rosada-marrón de quesos tradicionales de leche cruda asociada a *Yarrowia lipolytica*.
5. Los alimentos y sus materias primas, tanto de origen vegetal como animal, suponen una fuente inagotable de cepas con capacidad antagonista para el control del desarrollo de hongos alterantes en estos alimentos. La selección, caracterización y aplicación de estas levaduras autóctonas puede contribuir a la sostenibilidad y seguridad alimentarias en las producciones agroalimentarias, favoreciendo la reducción de fungicidas químicos de síntesis.

BIBLIOGRAFÍA

X. Bibliografía

Web

Alimentarius, C. (2011). *Proposed draft maximum levels for deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives in cereals and cereal-based products. Codex Committee on Contaminants in Food. European Union, Hague, Netherlands. CX. CF 11/5/6.* http://www.fao.org/input/download/report/758/REP11_CFe.pdf

FAO. World Agriculture: Towards 2015/2030 Summary Report Food and Agriculture Organization of the United Nations (2002) <https://www.fao.org/3/y3557e/y3557e.pdf> (Último acceso diciembre 2023).

Farr, D. F.; Rossman, A. Y. ARS, USDA. Fungal Databases, Systematic Botany & Mycology Laboratory, 2016b. <https://fungi.ars.usda.gov/>. (Último acceso diciembre 2023).

Farr, D. F.; Rossman, A. Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, 2016a. USDA. <https://fungi.ars.usda.gov/>. (Último acceso diciembre 2023).

International Agency for Research on Cancer (IARC). Available online: <https://www.iarc.fr/> (Último acceso en diciembre 2023).

Kolde R. (2019). Pheatmap: Brett's heatmap. Paquet R. Disponible: <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap> (Último acceso diciembre 2023).

Red de Asesoramiento al Regante de Extremadura (REDAREX). Condiciones climáticas durante el crecimiento de la uva durante el año 2018, en él se pueden observar las temperaturas máximas, mínimas y medias expresada en °C, las precipitaciones expresadas en L/m². Disponible en <http://redarexplus.gobex.es>. (Último acceso diciembre 2020).

Bibliografía

The European Green Deal. 2019. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Available online: https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/european-green-deal-communication_en.pdf (accessed on 4 October 2020).

- Abate, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S., & Faretra, F. (2018^b). Mating system in the brown rot pathogens *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, and *M. fructigena*. *Phytopathology*, *108*(11), 1315-1325.
- Abate, D., Pastore, C., Gerin, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S., & Faretra, F. (2018^a). Characterization of *Monilinia* spp. Populations on stone fruit in south Italy. *Plant Disease*, *102*(9), 1708–1717.
- Abbas, M., Naz, S. A., Shafique, M., Jabeen, N., & Abbas, S. (2019). Fungal contamination in dried fruits and nuts: A possible source of mycosis and mycotoxicosis. *Pakistan Journal of Botany*, *51*(4), 1523-1529.
- Abd-Elsalam, K. A. (2020). Multifunctional hybrid nanomaterials for sustainable agri-food and ecosystems: a note from the editor. In *Multifunctional Hybrid Nanomaterials for Sustainable Agri-Food and Ecosystems* (pp. 1-19). Elsevier.
- Abdullah, Q., Mahmoud, A., & Al-Harethi, A. (2016). Isolation and identification of fungal post-harvest rot of some fruits in Yemen. *PSM Microbiology*, *01*(1), 36–44.
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2000). Factors affecting the growth and survival of microorganisms in foods. *Food microbiology*. Royal society of chemistry.
- Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D., & Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International journal of food microbiology*, *69*(1-2), 25-36.
- Adjrah, Y., Dovlo, A., Karou, S. D., Eklu-Gadegbeku, K., Agbonon, A., de Souza, C., & Gbeassor, M. (2013). Survey of pesticide application on vegetables in the Littoral area of Togo. *Annals of agricultural and environmental medicine*, *20*(4).
- Adrees, H., Haider, M. S., Anjum, T., & Akram, W. (2019). Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. *Crop protection*, *115*, 75-83.

Bibliografía

- Afolabi, A. O., Olotu, O. O., & Alagbonsi, I. A. (2012). Vitamins E and C alleviate the germ cell loss and oxidative stress in cryptorchidism when administered separately but not when combined in rats. *ISRN Pharmacology*, 2012, 1–8.
- Agirman, B., Carsanba, E., Settanni, L., & Erten, H. (2023). Exploring yeast-based microbial interactions: The next frontier in postharvest biocontrol. *Yeast*, 40(10), 457-475.
- Aglar, E., Ozturk, B., Guler, S. K., Karakaya, O., Uzun, S., & Saracoglu, O. (2017). Effect of modified atmosphere packaging and ‘Parka’ treatments on fruit quality characteristics of sweet cherry fruits (*Prunus avium* L. ‘0900 Ziraat’) during cold storage and shelf life. *Scientia horticulturae*, 222, 162-168.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Skiada, V., & Varzakas, T. (2022). Nanobiotechnology in food preservation and molecular perspective. *Nanotechnology-Enhanced Food Packaging*, 327-359.
- Aiello, D., Restuccia, C., Stefani, E., Vitale, A., & Cirvilleri, G. (2019). Postharvest biocontrol ability of *Pseudomonas synxantha* against *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 83–89.
- Ainiza, W. M., Jinap, S., & Sanny, M. (2015). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. *Food Control*, 50, 913–918.
- Akpo-Djènantin, D. O. O., Gbaguidi, F., Soumanou, M. M., & Anihouvi, V. B. (2018). Mold infestation and aflatoxins production in traditionally processed spices and aromatic herbs powder mostly used in West Africa. *Food Science and Nutrition*, 6(3), 541–548.
- Al Ghamdi, F. L., Bokhari, F. M., & Aly, M. M. (2019). Toxigenic fungi associated with dried Fruits and fruit-based products collected from Jeddah province. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 14, 10-20.
- Alasmar, R., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Thani, R., Al-Shamary, N., Alnaimi, H., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2020). Isolation of a novel *Kluyveromyces marxianus*

- Strain QKM-4 and evidence of its volatilome production and binding potentialities in the biocontrol of toxigenic fungi and their mycotoxins. *ACS Omega*, 5(28), 17637–17645.
- Albuquerque, P., & Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology*, 50(4), 337-345.
- Albuquerque, P., Nicola, A. M., Nieves, E., Paes, H. C., Williamson, P. R., Silva-Pereira, I., & Casadevall, A. (2014). Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, 5(1), 10-1128.
- Alewu, B., & Nosiri, C. (2011). Pesticides and human health. In *Pesticides in the modern world—effects of pesticides exposure*. (pp. 231-50). INtechOpen
- Al-Hindi, R. R. (2013). Cell wall-degrading enzymes of fruit spoilage fungi. *Life Science Journal*, 10, 2456-2463.
- Al-hindi, R. R., Al-najada, A. R., & Mohamed, S. A. (2011). Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: screening of plant cell wall degrading enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, 5(4), 443–448.
- Alhussaini, M. S. (2012). Mycobiota and mycotoxins of nuts and some dried fruits from Saudi Arabia. *Journal of American Science*, 8(12), 525-534.
- Ali, H. S., Moharram, H. A., Ramadan, M. T., & Ragab, G. H. (2010). Osmotic dehydration of banana rings and tomato halves. *Journal of American Science*, 6(9), 384-390.
- Alía, A., Andrade, M. J., Rodríguez, A., Reyes-Prieto, M., Bernáldez, V., & Córdoba, J. J. (2016). Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. *Meat Science*, 122, 16–24.
- Alique, R., Martínez, M. A., & Alonso, J. (2003). Influence of the modified atmosphere packaging on shelf life and quality of Navalinda sweet cherry. *European Food Research and Technology*, 217, 416-420.

Bibliografía

- Alkuwari, A., Hassan, Z. U., Zeidan, R., Al-Thani, R., & Jaoua, S. (2022). Occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in cereals and application of yeast volatiles for their biological control. *Toxins*, 14(6), 404.
- Aloui, H., Licciardello, F., Khwaldia, K., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2015). Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 22–30.
- Al-Qaysi, S. A., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W. H. A. A. R., & Ibrahim, J. A. A. R. (2017). Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International Journal of Microbiology*, 2017.
- Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Minkoumba Sonfack, G., Fedrizzi, G., & Caprai, E. (2021). Occurrence of ochratoxin A in different types of cheese offered for sale in Italy. *Toxins*, 13(8), 540.
- Amin, M., Malik, A. U., Khan, A. S., & Javed, N. (2011). Potential of fungicides and plant activator for postharvest disease management in mangoes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(5), 671-676.
- Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6, 1-22.
- Ando, H., Hatanaka, K., Ohata, I., Yamashita-Kitaguchi, Y., Kurata, A., & Kishimoto, N. (2012). Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control*, 26(2), 472–478.
- Andrade, M. J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J. J., & Jespersen, L. (2014). Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 70–77.

- Andreani, N. A., Carraro, L., Martino, M. E., Fondi, M., Fasolato, L., Miotto, G., ... & Cardazzo, B. (2015). A genomic and transcriptomic approach to investigate the blue pigment phenotype in *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 213, 88-98.
- Antunes, J., & Aguiar, C. (2012). Search for killer phenotypes with potential for biological control. *Annals of Microbiology*, 62, 427-433.
- Anwer, M. A. (2015). Advances in postharvest disease control in vegetables. In *Postharvest Biology and Technology of Horticultural Crops: Principles and Practices for Quality Maintenance*, (pp. 505-541). CRC Press.
- Apte, M., Girme, G., Bankar, A., RaviKumar, A., & Zinjarde, S. (2013). 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1), 1-9.
- Araguás, C., González-Peñas, E., & De Cerain, A. L. (2005). Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food chemistry*, 92(3), 459-464.
- Aran, N., & Eke, D. (1987). Mould mycoflora of Kaşar cheese at the stage of consumption. *Food Microbiology*, 4(2), 101–104.
- Araújo-Rodrigues, H., Tavaría, F. K., dos Santos, M. T. P., Alvarenga, N., & Pintado, M. M. (2020). A review on microbiological and technological aspects of Serpa PDO cheese: An ovine raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 100, 104561.
- Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 182–188.
- Armando, M. R., Dogi, C. A., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production at different interacting environmental conditions, *in vitro*. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 29(9), 1443–1449.

Bibliografía

- Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, S. (2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control*, *109*, 14–20.
- Arrarte, E., Zaccari, F., Garmendia, G., Castiglioni, J., & Vero, S. (2022). Antifungal activity of chitosan and its combination with the yeast *Debaryomyces hansenii* F9D for the control of *Penicillium expansum* in apples and pears stored at low temperatures. *International Journal of Pest Management*, *68*(4), 339-348.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, *53*(1), 122–128.
- Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., & Jiménez-Díaz, R. (2012). Formation of lactic acid bacteria-yeasts communities on the olive surface during Spanish-style Manzanilla fermentations. *Food Microbiology*, *32*(2), 295–301.
- Arvanitoyannis, I. S., Stratakos, A. C., & Tsarouhas, P. (2009). Irradiation applications in vegetables and fruits: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *49*(5), 427-462.
- Asghar, M. A., Zahir, E., Rantilal, S., Ahmed, A., & Iqbal, J. (2016). Aflatoxins in composite spices collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, *9*(2), 113–119.
- Ashiq, S. (2015). Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(2), 159–175.
- Assaf, L. R., Pedrozo, L. P., Nally, M. C., Pesce, V. M., Toro, M. E., de Figueroa, L. C., & Vazquez, F. (2020). Use of yeasts from different environments for the control of *Penicillium expansum* on table grapes at storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, *320*, 108520.

- Atasever, M. A., Adıgüzel, G., Atasever, M., Özturan, K., & Cops, N. A. (2010). Determination of Aflatoxin M1 levels in some cheese types consumed in Erzurum-Turkey *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 87–91.
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., & Mohd Adzahan, N. (2014). Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 1–7.
- Bachmann, H. P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M. G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M. T., & Fürst, M. (2005). Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias *Anticollanti* on smear-ripened cheeses. *LWT-Food Science and Technology*, 38(4), 399-407.
- Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645–656.
- Baker, C. G. J. (1997). Dryer selection. In *Industrial drying of foods*, 242-270. Springer.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 23–29.
- Barber, M. F., & Elde, N. C. (2015). Buried treasure: evolutionary perspectives on microbial iron piracy. *Trends in Genetics*, 31(11), 627-636.
- Bardas, G. A., Tzelepis, G. D., Lotos, L., & Karaoglanidis, G. S. (2009). First report of *Penicillium glabrum* causing fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*) in Greece. *Plant Disease*, 93(12), 1347-1347.
- Barrios, M. J., Medina, L. M., Lopez, M. C., & Jordano', R. (1998). Fungal biota isolated from Spanish cheeses. *Journal of Food Safety*, 18(2), 151–157.

Bibliografía

- Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., Goldway M., Wisniewski M. & Droby, S. (2004). Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*, 45, 140-148.
- Basílico, J. C., de Basílico, M. Z., Chiericatti, C., & Vinderola, C. G. (2001). Characterization and control of thread mould in cheese. *Letters in applied microbiology*, 32(6), 419-423.
- Batta, Y. A. (2006). Quantitative postharvest contamination and transmission of *Penicillium expansum* (Link) conidia to nectarine and pear fruit by *Drosophila melanogaster* (Meig.) adults. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 190–196.
- Batta, Y. A. (2007). Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Postharvest Biology and Technology*, 43(1), 143–150.
- Bautista-Rosales, P. U., Calderon-Santoyo, M., Servín-Villegas, R., Ochoa-Álvarez, N. A., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2013). Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control*, 65(3), 293–301.
- Bayman, P., Baker, J. L., & Mahoney, N. E. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, 155, 161-169.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2017). The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, 9(4), 112.
- Ben Tahar, I., Kus-Liśkiewicz, M., Lara, Y., Javaux, E., & Fickers, P. (2020). Characterization of a nontoxic pyomelanin pigment produced by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Progress*, 36(2), e2912.
- Benedict, K., Chiller, T. M., & Mody, R. K. (2016). Invasive fungal infections acquired from contaminated food or nutritional supplements: a review of the literature. *Foodborne pathogens and disease*, 13(7), 343-349.

- Benford D, Boyle C, Dekant W, Fuchs R, Gaylor DW, Hard G, McGregor DB, Pitt JI, Plestina R, Shephard G, Solfrizzo M, Verger PJP, Walker R (2001) Ochratoxin A. In: Safety evaluations of certain mycotoxins in food, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, IPCS International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, pp. 281–387.
- Benítez-Cabello, A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2015). Evaluation and identification of poly-microbial biofilms on natural green Gordal table olives. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(3), 597–610.
- Beresford, T., & Williams, A. (2004). The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1, 287-318.
- Bernaldez, V., Córdoba, J. J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., & Rodríguez, A. (2013). Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón.” *Food Control*, 32(1), 69–76.
- Bernardi, A. O., Stefanello, A., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2021). The control of cheese and meat product spoilage fungi by sanitizers: *In vitro* testing and food industry usage. *LWT*, 144, 111204.
- Berrie, A. M., & Holb, I. (2014). Brown rot diseases. *Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests*, 2nd ed. TB Sutton, HS Aldwinckle, AM Angelo, and JF Walgenbach, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, (pp 43-45).
- Bhat, R., Ameran, S. B., Voon, H. C., Karim, A. A., & Tze, L. M. (2011). Quality attributes of starfruit (*Averrhoa carambola* L.) juice treated with ultraviolet radiation. *Food Chemistry*, 127(2), 641–644.
- Bhatnagar-Mathur, P., Sunkara, S., Bhatnagar-Panwar, M., Waliyar, F., & Sharma, K. K. (2015). Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science*, 234, 119–132.

Bibliografía

- Biango-Daniels, M. N., & Wolfe, B. E. (2021). American artisan cheese quality and spoilage: A survey of cheesemakers' concerns and needs. *Journal of Dairy Science*, *104*(5), 6283–6294.
- Biasi, A., Yeka Zhimo, V., Kumar, A., Abdelfattah, A., Salim, S., Feygenberg, O., Wisniewski, M., Droby, S., Editors, A., Di Francesco, A., Romanazzi, G., & Torres, R. (2021). Changes in the fungal community assembly of apple fruit following postharvest application of the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Horticulturae*, *7*(10), 360.
- Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS microbiology*, *7*(4), 447.
- Blackburn, C. D. W. (2006). Managing microbial food spoilage: an overview. *Food spoilage microorganisms*, (pp 147-170). CRC Press
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(2), 204–209.
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Mycotoxins in Plant Disease: Under the aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998-2003', EU project (QLK 1-CT-1998-01380), and ISPP 'Fusarium Committee'*, 611-624.
- Bougreau, M., Ascencio, K., Bugarel, M., Nightingale, K., & Loneragan, G. (2019). Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. *PLoS ONE*, *14*(5), 1–15.
- Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Belguesmi, F., Bacha, H., & Abid-Essefi, S. (2016). Tissue oxidative stress induced by patulin and protective effect of crocin. *NeuroToxicology*, *53*, 343–349.
- Božovic, M., Garzoli, S., Sabatino, M., Pepi, F., Baldisserotto, A., Andreotti, E., Romagnoli, C., Mai, A., Manfredini, S., & Ragno, R. (2017). Essential oil extraction,

- chemical analysis and anti-*Candida* activity of *calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) ball-new approaches. *Molecules*, 22(2).
- Bradford, K. J., Dahal, P., Van Asbrouck, J., Kunusoth, K., Bello, P., Thompson, J., & Wu, F. (2018). The dry chain: Reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 84–93.
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 1-17.
- Bruna, J. M., Ordóñez, J. A., Fernández, M., Herranz, B., & De La Hoz, L. (2001). Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Science*, 59(1), 87–96.
- Buerth, C., Tielker, D., & Ernst, J. F. (2016). *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 6981-6990.
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2009). Food safety issues and the microbiology of cereals and cereal products. In *Microbiologically safe foods*, 315-335.
- Bullerman, L. B., & Olivigni, F. J. (1974). Mycotoxin producing-potential of molds isolated from cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 39(6), 1166–1168.
- Bürger, J., de Mol, F., & Gerowitt, B. (2008). The “necessary extent” of pesticide use—Thoughts about a key term in German pesticide policy. *Crop Protection*, 27(3-5), 343-351.
- Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*, 36(3), 162-167.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O’Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in microbiology*, 8, 34.

Bibliografía

- Buzdar, M. A., Chi, Z., Wang, Q., Hua, M. X., & Chi, Z. M. (2011). Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(6), 1571–1579.
- Buzzini, P., Corazzi, L., Turchetti, B., Buratta, M., & Martini, A. (2004). Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, *238*(2), 359–365.
- Calado, T., Venâncio, A., & Abrunhosa, L. (2014). Irradiation for mold and mycotoxin control: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(5), 1049–1061.
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., & Venturini, M. E. (2017). Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food microbiology*, *63*, 101-110.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, *166*, 111208.
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., Budroni, M., Mannazzu, I., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2017). Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in Genomic Sciences*, *12*(1). 1-14.
- Cantoni, C., Stella, S., Cozzi, M., Iacumin, L., & Comi, G. (2003). Blue colouring in mozzarella cheese. *Industrie Alimentari*, *42*, 840e843.
- Cantoni, C., Stella, S., Ripamonti, B., & Marchese, R. (2001). Anomalous colouration of mozzarella cheese. *Industrie Alimentari*, *40*(399), 33-35.
- Capilla, A. (2017). Selección de levaduras antagónicas por su capacidad de producir compuestos volátiles orgánicos antifúngicos & parasitar hifas. Trabajo Fin de

- Master. Escuela de Ing. Agrarias, Universidad de Extremadura, Badajoz. Septiembre 2017.
- Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E., & Piro, F. (2010). Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology*, 27(8), 1071–1077.
- Carisse, O., & Van Der Heyden, H. (2015). Relationship of airborne *Botrytis cinerea* conidium concentration to tomato flower and stem infections: A threshold for de-leafing operations. *Plant Disease*, 99(1), 137-142.
- Carminati, D., Bonvini, B., Rossetti, L., Zago, M., Tidona, F., & Giraffa, G. (2019). Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese. *Food Control*, 100, 321-328.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3), 121.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295.
- Carrascosa, C., Martínez, R., Sanjuán, E., Millán, R., del Rosario-Quintana, C., Acosta, F., ... & Jaber, J. R. (2021). Identification of the *Pseudomonas fluorescens* group as being responsible for blue pigment on fresh cheese. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6548-6558.
- Carrascosa, C., Millán, R., Jaber, J. R., Lupiola, P., del Rosario-Quintana, C., Mauricio, C., & Sanjuán, E. (2015). Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 54, 95-102.
- Carreira, A., Dillinger, K., Eliskases-Lechner, F., Loureiro, V., Ginzinger, W., & Rohm, H. (2002). Influence of selected factors on browning of Camembert cheese. *Journal of dairy research*, 69(2), 281-292.

Bibliografía

- Carreira, A., Ferreira, L. M., & Loureiro, V. (2001). Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3463-3468.
- Carreira, A., Paloma, L., & Loureiro, V. (1998). Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), 223-230.
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6: 48-60.
- Casals, C., Viñas, I., Torres, R., Griera, C., & Usall, J. (2010). Effect of temperature and water activity on *in vitro* germination of *Monilinia* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 47–54.
- Casquete, R., Rodríguez, A., Hernández, A., Martín, A., Bartolomé, T., Córdoba, J. J., & Córdoba, M. G. (2017). Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins during smoked paprika production. *Journal of Food Protection*, 80(12), 2068–2077.
- Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., & Vignolo, G. M. (2017). Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: A focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms*, 5(3), 38.
- Castellari, C., Quadrelli, A. M., & Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 149–155.
- Castell-Palou, Á., & Simal, S. (2011). Heat pump drying kinetics of a pressed type cheese. *LWT: Food Science and Technology*, 44(2), 489–494.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., & De Cicco, V. (1997). β -1, 3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3), 293-300.

- Castrillo, D., Rabuñal, E., Neira, N., & Blanco, P. (2019). Yeast diversity on grapes from Galicia, NW Spain: Biogeographical patterns and the influence of the farming system. *Oeno One*, 53(3), 573–587.
- Cence, K., Santos, P. dos, Garcia, M. V., Copetti, M. V., Valduga, E., Cansian, R. L., Zeni, J., & Backes, G. T. (2019). Enzymatic biocontrol of spoilage fungi from salami. *Lwt*, 115, 108457.
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., & Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 32(1), 230–241.
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., & Panijpan, B. (2007). Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, 42(3), 326–335.
- Chatterton, S., Wylie, A. C., & Punja, Z. K. (2012). Fruit infection and postharvest decay of greenhouse tomatoes caused by *Penicillium* species in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4), 524–535.
- Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R. O., & Laich, F. (2011). Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. *Mycofactories*, 26, 73-98.
- Chen, K., Tian, Z., He, H., Long, C. A., & Jiang, F. (2020). Bacillus species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological control*, 151, 104419.
- Chen, P. H., Chen, R. Y., & Chou, J. Y. (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46(1), 33–46.
- Chen, W. B., Han, Y. F., Jong, S. C., & Chang, S. C. (2000). Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5348-5352.

Bibliografía

- Cheong, E. Y., Sandhu, A., Jayabalan, J., Le, T. T. K., Nhiep, N. T., Ho, H. T. M., Zwielehner J., Bansal N. & Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97.
- Chessa, R., Landolfo, S., Ciani, M., Budroni, M., Zara, S., Ustun, M., Cakar, Z. P., & Mannazzu, I. (2017). Biotechnological exploitation of *Tetrapisispora phaffii* killer toxin: heterologous production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2931–2942.
- Chi, Z. M., Liu, G., Zhao, S., Li, J., & Peng, Y. (2010). Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1227-1241.
- Chierici, M., Picozzi, C., La Spina, M. G., Orsi, C., Vigentini, I., Zambrini, V., & Foschino, R. (2016). Strain diversity of *Pseudomonas fluorescens* group with potential blue pigment phenotype isolated from dairy products. *Journal of Food Protection*, 79(8), 1430-1435.
- Chirife, J., & Resnik, S. L. (1984). Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. *Journal of Food Science*, 49(6), 1486-1488.
- Choińska, R., Piasecka-Józwiak, K., Chabłowska, B., Dumka, J., & Łukaszewicz, A. (2020). Biocontrol ability and volatile organic compounds production as a putative mode of action of yeast strains isolated from organic grapes and rye grains. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(8), 1135–1146.
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3484–3492.

- Coda, R., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Trani, A., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2013). Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiology*, 33(2), 243–251.
- CODEX STAN 192-1995. (2013). Norma General Del Codex para el aditivo de frutas & derivados de frutas. *CODEX Alimentarius*, 1–4.
- CODEX STAN 283-1978. (2013). Norma General Del Codex para el queso. *CODEX Alimentarius*, 1–4.
- Coelho, A. R., Tachi, M., Pagnocca, F. C., Nobrega, G. M. A., Hoffmann, F. L., Harada, K. I., & Hirooka, E. Y. (2009). Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum*. *Food Additives and Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(1), 73–81.
- Colchin, L. M., Owens, S. L., Lyubachevskaya, G., Boyle-Roden, E., Russek-Cohen, E., & Rankin, S. A. (2001). Modified atmosphere packaged cheddar cheese shreds: influence of fluorescent light exposure and gas type on color and production of volatile compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2277-2282.
- Čolović, R., Puvača, N., Cheli, F., Avantaggiato, G., Greco, D., Đuragić, O., Kos J. & Pinotti, L. (2019). Decontamination of mycotoxin-contaminated feedstuffs and compound feed. *Toxins*, 11(11), 617.
- Comi, G. (2017). Spoilage of meat and fish. In *The microbiological quality of food* (pp. 179-210). Woodhead Publishing.
- Comi, G., & Iacumin, L. (2013). Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research International*, 54(1), 1113–1119.
- Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS microbiology letters*, 316(1), 77-82.

Bibliografía

- Comitini, F., Di Pietro, N., Zacchi, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004). *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: Purification and characterization. *Microbiology*, *150*(8), 2535–2541.
- Comitini, F., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2009). *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microbial Cell Factories*, *8*, 1-11.
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, *82*, 70–74.
- Copetti, V. M. (2019). Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 57–61.
- Çorbacı, C., & Uçar, F. B. (2017). Production and optimization of killer toxin in *Debaryomyces hansenii* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *60*, e17160339.
- Çorbacı, C., & Uçar, F. B. (2018). Purification, characterization and *in vivo* biocontrol efficiency of killer toxins from *Debaryomyces hansenii* strains. *International Journal of Biological Macromolecules*, *119*, 1077–1082.
- Cordeiro, R. de A., Teixeira, C. E. C., Brilhante, R. S. N., Castelo-Branco, D. S. C. M., Alencar, L. P., de Oliveira, J. S., Monteiro, A. J., Bandeira, T. J. P. G., Sidrim, J. J. C., Moreira, J. L. Bezerra, & Rocha, M. F. G. (2015). Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Research*, *15*(4), fov012.
- Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M., & Vigentini, I. (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2025.
- Cordova-Albores, L., Zapotitla, Es., Ríos, M., Barrera-Necha, L., Hernández-López, M., & Bautista-Baños, S. (2016). Microscopic study of the morphology and metabolic

- activity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* treated with *Jatropha curcas* oil and derivatives. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4(1), 28-35.
- Cosentino, S., Viale, S., Deplano, M., Fadda, M. E., & Pisano, M. B. (2018). Application of autochthonous *Lactobacillus* strains as biopreservatives to control fungal spoilage in Caciotta cheese. *BioMed Research International*, 2018, 3915615.
- Costa, A. F., Silva, L. D. C., & Amaral, A. C. (2021). Farnesol: An approach on biofilms and nanotechnology. *Medical Mycology*, 59(10), 958-969.
- Crespo, A., Jiménez, A., Ruiz-Moyano, S., Merchán, A. V., Galván, A. I., Benito, M. J., & Martín, A. (2022). Low-frequency ultrasound as a tool for quality control of soft-bodied raw ewe's milk cheeses. *Food Control*, 131, 108405.
- Crous, P.W.; Wingfield, M.J.; Guarro, J.; Hernández-Restrepo, M.; Sutton, D.A.; Acharya, K.; Barber, P.A.; Boekhout, T.; Dimitrov, R.A.; Dueñas, M.; *et al* (2015). Fungal Planet description sheets. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 167-266.
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A. D. W., Budroni, M., & Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4(12), 1468–1481.
- Da Cruz Cabral, L., Rodríguez, A., Andrade, M. J., Patriarca, A., & Delgado, J. (2021). Effect of *Debaryomyces hansenii* and the antifungal PgAFP protein on *Alternaria* spp. growth, toxin production, and RHO1 gene expression in a tomato-based medium. *Food Microbiology*, 97, 103741.
- Da Cunha, T., Ferraz, L. P., Wehr, P. P., & Kupper, K. C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 20–27.
- Da Silva, S., Calado, S., Lucas, C., & Aguiar, C. (2008). Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiological Research*, 163(2), 243–251.

Bibliografía

- Daghio, M., Pini, F., Espinoza-Tofalos, A., Conte, G., Mari, E., Giannerini, F., ... & Viti, C. (2022). Characterization of the microbial community in ripened Pecorino Toscano cheese affected by pink discoloration. *Food Microbiology*, 104, 104006.
- Dagnas, S. P., & Membré, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, 76(3), 538–551.
- Dalhoff, A. A. H., & Levy, S. B. (2015). Does use of the polyene natamycin as a food preservative jeopardise the clinical efficacy of amphotericin B? A word of concern. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 564–567.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria: Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21(4), 370-380.
- Dall'Asta, C., De Dea Lindner, J., Galaverna, G., Dossena, A., Neviani, E., & Marchelli, R. (2008). The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, 106(2), 729–734.
- Daly, D., McSweeney, P., & Sheehan, J. (2012). Pink discolouration defect in commercial cheese: a review. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 439-453.
- Darakshan, S., Allai, F. M., Jabeen, A., Parveen, S., & Gul, K. (2020). Microbial Spoilage of Fruits. In *Emerging Technologies for Shelf-Life Enhancement of Fruits* (pp. 49-76). CRC Press.
- Davies, C. R., Wohlgemuth, F., Young, T., Violet, J., Dickinson, M., Sanders, J. W., Vallieres, C., & Avery, S. V. (2021). Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. *Fungal biology reviews*, 36, 15-26
- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., De Oliveira, M. E. G., & De Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44(5), 1541–1548.

- De Boevre, M., Di Mavungu, J. D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G., & De Saeger, S. (2012). Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin Journal*, 5(3), 207–219.
- De Cal, A., Gell, I., Usall, J., Viñas, I., & Melgarejo, P. (2009). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in peach orchards in Ebro Valley, Spain. *Plant Disease*, 93(7), 763-763.
- De Ingeniis, J., Raffaelli, N., Ciani, M., & Mannazzu, I. (2009). *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1129–1134.
- De Melo, F. T., de Oliveira, I. M., Greggio, S., Dacosta, J. C., Guecheva, T. N., Saffi, J., Henriques, J. A. P., & Rosa, R. M. (2012). DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3548–3555.
- de Oliveira, T. M., de Fátima Ferreira Soares, N., Pereira, R. M., & de Freitas Fraga, K. (2007). Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 20(2), 147-153.
- De Paiva, E., Serradilla, M. J., Ruiz-Moyano, S., Córdoba, M. G., Villalobos, M. C., Casquete, R., & Hernández, A. (2017). Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunés. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 276–282.
- de Souza Sant’Ana, A., Rosenthal, A., & de Massaguer, P. R. (2008). The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, 41(5), 441-453.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd J.J., *et al.* (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

Bibliografía

- del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2018). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 86, 359-366.
- Delali, K. I., Chen, O., Wang, W., Yi, L., Deng, L., & Zeng, K. (2021). Evaluation of yeast isolates from kimchi with antagonistic activity against green mold in citrus and elucidating the action mechanisms of three yeast: *P. kudriavzevii*, *K. marxianus*, and *Y. lipolytica*. *Postharvest Biology and Technology*, 176, 111495.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Ladero, L., Cava, R., & Ramírez, R. (2009). Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO 'Torta del Casar') during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1721-1728.
- Delgado, J., Acosta, R., Rodríguez-Martín, A., Bermúdez, E., Núñez, F., & Asensio, M. A. (2015^a). Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 23-29.
- Delgado, J., Ballester, A. R., González-Candelas, L., & Núñez, F. (2022). Impact of the antifungal protein PgAFP on the proteome and patulin production of *Penicillium expansum* on apple-based medium. *International journal of food microbiology*, 363, 109511.
- Delgado, J., Ballester, A. R., Núñez, F., & González-Candelas, L. (2019^b). Evaluation of the activity of the antifungal PgAFP protein and its producer mould against *Penicillium* spp postharvest pathogens of citrus and pome fruits. *Food Microbiology*, 84, 103266.
- Delgado, J., Owens, R. A., Doyle, S., Asensio, M. A., & Núñez, F. (2015^b). Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(20), 8701-8715.
- Delgado, J., Peromingo, B., Núñez, F., & Asensio, M. A. (2016). Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Current Opinion in Food Science*, 11, 40-45.

- Delgado, J., Peromingo, B., Rodríguez, A., & Rodríguez, M. (2019^a). Biocontrol of *Penicillium griseofulvum* to reduce cyclopiazonic acid contamination in dry-fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 293, 1-6.
- Delory, B. M., Delaplace, P., du Jardin, P., & Fauconnier, M. L. (2016). Barley (*Hordeum distichon* L.) roots synthesise volatile aldehydes with a strong age-dependent pattern and release (E)-non-2-enal and (E, Z)-nona-2,6-dienal after mechanical injury. *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 134–145.
- Deng, L. Z., Tao, Y., Mujumdar, A. S., Pan, Z., Chen, C., Yang, X. H., Liu, Z. L., Wang, H., & Xiao, H. W. (2020). Recent advances in non-thermal decontamination technologies for microorganisms and mycotoxins in low-moisture foods. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 104–112.
- Devi, Y., Thirumdas, R., Sarangapani, C., Deshmukh, R. R., & Annapure, U. S. (2017). Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. *Food Control*, 77, 187–191.
- Di Francesco, A., & Mari, M. (2018). *Monilinia* species of fruit decay: A comparison between biological and epidemiological data. *Italian Journal of Mycology*, 47, 13-23.
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *European Journal of Plant Pathology*, 145, 711-717.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., & Mari, M. (2015). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, 81, 8–14.
- Díaz-Mula, H. M., Serrano, M., & Valero, D. (2012). Alginate coatings preserve fruit quality and bioactive compounds during storage of sweet cherry fruit. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2990-2997.

Bibliografía

- Dichtl, K., Ebel, F., Dirr, F., Routier, F. H., Heesemann, J., & Wagener, J. (2010). Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, 76(5), 1191–1204.
- Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S., & West, S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450(7168), 411-414.
- Diguta, C. F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., & Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28(6), 1145–1154.
- Dimakopoulou, M., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E. A., & Tjamos, E. C. (2008). Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control*, 46(2), 158–165.
- Dogi, C. A., Armando, R., Ludueña, R., de Moreno de LeBlanc, A., Rosa, C. A. R., Dalcero, A., & Cavaglieri, L. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 28(12), 1705–1711.
- Dos Santos, J. S., Souza, T. M., Ono, E. Y. S., Hashimoto, E. H., Bassoi, M. C., de Miranda, M. Z., Itano E. N., Kawamura O. & Hirooka, E. Y. (2013). Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. *Food Chemistry*, 138(1), 90-95.
- Dos Santos, M. T. P. G., Benito, M. J., de Guía Córdoba, M., Alvarenga, N., & de Herrera, S. R. M. S. (2017). Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and-independent DNA approaches. *International journal of food microbiology*, 262, 63-70.
- Doster, M. A., & Michailides, T. J. (2007). Fungal decay of first crop and main-crop figs. *Plant disease*, 91(12), 1657-1662.

- Droby, S., & Lichter, A. (2007). Post-harvest Botrytis infection: etiology, development and management. In *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 349-367). Springer.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E., & Porat, R. (2002). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92(4), 393-399.
- Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D., & Pais, C. (2016). Yeast biodiversity in vineyard environments is increased by human intervention. *PLoS ONE*, 11(8), 1–13.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16-32.
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(9), 1498-1513.
- Dukare, A. S., Singh, R. K., Jangra, R. K., & Bhushan, B. (2020). Non-fungicides-based promising technologies for managing post-production *Penicillium* induced spoilage in horticultural commodities: A comprehensive review. *Food Reviews International*, 38(3), 227-267.
- Ehlers, R. U. (2011). Regulation of biological control agents and the EU policy support action REBECA. In *Regulation of biological control agents* (pp. 3-23). Springer.
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461-493.
- Elhariry, H., Bahobial, A. A., & Gherbawy, Y. (2011). Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 941–946.

Bibliografía

- Elshafie, H. S., Camele, I., Racioppi, R., Scrano, L., Iacobellis, N. S., & Bufo, S. A. (2012). *In vitro* antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some phytopathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*, 16291–16302.
- Enyiukwu, D. N., Basse, I. N., Nwaogu, G. A., Chukwu, L. A., & Maranzu, J. O. (2020). Postharvest spoilage and management of fruits and vegetables: A perspective on small-holder agricultural systems of the tropics. *Greener Trends in Plant Pathology and Entomology*, *3*, 001-017.
- Errampalli, D. (2014). *Penicillium expansum* (blue mold). In *Postharvest decay* (pp. 189-231). Academic Press.
- Erten, H., Agirman, B., Boyaci-Gunduz, C. P., Carsanba, E., & Leventdurur, S. (2019). Natural microflora of different types of foods. *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies*, 51-93.
- Esmer, O. K., Balkir, P., Seckin, A. K., & Irkin, R. (2009). The effect of modified atmosphere and vacuum packaging on the physicochemical, microbiological, sensory and textural properties of Crottin de Chavignol cheese. *Food science and technology research*, *15*(4), 367-376.
- Estiarte, N., Crespo-Sempere, A., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2017). Exploring polyamine metabolism of *Alternaria alternata* to target new substances to control the fungal infection. *Food Microbiology*, *65*, 193–204.
- Esturk, O., Ayhan, Z., & Ustunel, M. A. (2012). Modified atmosphere packaging of “Napoleon” cherry: Effect of packaging material and storage time on physical, chemical, and sensory quality. *Food and Bioprocess Technology*, *5*, 1295-1304.
- European Commission, Directorate-General for Health and Consumers. (2013). *Commission Implementing Regulation (EU) No 373/2013 of 23 April 2013 approving the active substance *Candida oleophila*, strain O*.
- European Commission. (2019). *Communication from the Commission to the European Parliament, The European Council, The Council, The European Economic and*

Social Committee and The Committee of the Regions, The European Green Deal. COM/2019/640. Brussels, Belgium.

European Commission. (2020). Farm to fork strategy: for a fair, healthy and environmentally friendly food system. *Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions*, 381, 1-9.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., *et al.* (2022). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. *EFSA Journal*, 20(1), e07045.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., *et al.* (2020). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019). *EFSA Journal*, 18(2), e05966.

European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., ... & Villamar-Bouza, L. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Metschnikowia fructicola* NRRL Y-27328. *EFSA Journal*, 15(12), e05084.

European Food Safety Authority (EFSA). (2015). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Saccharomyces cerevisiae* strain LAS02. *EFSA Journal*, 13(12), 4322.

European Food Safety Authority. (2012). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Candida oleophila* strain O. *EFSA Journal*, 10(11), 2944.

Ewekeye, T. S., Oke, O. A., Quadri, A. I., Isikalu, A. O., & Umenwaniri, M. O. (2013). Studies on post-harvest deterioration of some fruits and vegetables in selected

Bibliografía

- markets in Lagos State, Nigeria. *American Journal of Research Communication*, 1(10), 209–223.
- Fagan, C. C., O’Callaghan, D. J., Mateo, M. J., & Dejmek, P. (2017). The syneresis of rennet-coagulated curd. In *Cheese* (pp. 145-177). Academic Press.
- Fakruddin, M. D., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-11.
- Falade, K. O., Igbeka, J. C., & Ayanwuyi, F. A. (2007). Kinetics of mass transfer, and colour changes during osmotic dehydration of watermelon. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 979–985.
- Farbo, M. G., Urgeghe, P. P., Fiori, S., Marcello, A., Oggiano, S., Balmas, V., Hassan, Z. U., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2018). Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 1–10.
- Farkas, J., & Mohácsi-Farkas, C. (2011). History and future of food irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2–3), 121–126.
- Fasuan, A. A., Akin-Obasola, B., & Abiodun, B. O. (2021). Water activity relations of spoilage fungi associated with smoke-dried catfish (*Clarias gariepinus*) sold in some open markets in Nigeria. *Journal of Food Science and Technology*, 1-9.
- Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Christensen, M. O., Boege, F., Altemöller, M., Podlech, J., & Marko, D. (2009). Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. *Molecular nutrition & food research*, 53(4), 441-451.
- Feng, H., & Yang, W. (2011). Ultrasonic processing. In *Nonthermal processing technologies for food* (pp. 135-154). Wiley-Blackwell and IFT Press, UK.
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., & Fliss, I. (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control*, 78, 350–356.

- Fernández-Pacheco, P., Ramos Monge, I. M., Poveda, J. M., Díaz-Maroto, M. C., & Arévalo-Villena, M. (2023). Use of probiotic yeasts with biocontrol activity for fermentation of ewe's milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 103 (8), 4107-4118.
- Ferruz, E., Loran, S., Herrera, M., Gimenez, I., Bervis, N., Barcena, C., ... & Ariño, A. (2016). Inhibition of *Fusarium* growth and mycotoxin production in culture medium and in maize kernels by natural phenolic acids. *Journal of food protection*, 79(10), 1753-1758.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 85–102.
- Fiori, S., Fadda, A., Giobbe, S., Berardi, E., & Migheli, Q. (2008). *Pichia angusta* is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola*. *FEMS Yeast Research*, 8(6), 961–963.
- Fiori, S., Urgeghe, P. P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non-and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International journal of food microbiology*, 189, 45-50.
- Fleet, G. H. (2011). Chapter 5-Yeast Spoilage of Foods and Beverages the Yeasts. *Elsevier London*, 53-63.
- Fodil, S., Delgado, J., Varvaro, L., Yaseen, T., & Rodríguez, A. (2018). Effect of potassium sorbate (E-202) and the antifungal PgAFP protein on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production in raisin simulating media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5785-5794.
- Fourie, P. H., Du Preez, M., Brink, J. C., & Schutte, G. C. (2009). The effect of runoff on spray deposition and control of *Alternaria* brown spot of mandarins. *Australasian Plant Pathology*, 38, 173-182.

Bibliografía

- Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M. E., Lingsten, K. J., & Schnürer, J. (2002). Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 395-402.
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-19.
- Frisvad, J. C., Thrane, U., & Samson, R. A. (2007). Mycotoxin producers. In *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, (pp. 135–160). CRC Press.
- Fröhlich-Wyder, M. T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(3), 129–141.
- Fucà, N., McMahon, D. J., Caccamo, M., Tuminello, L., La Terra, S., Manenti, M., & Licitra, G. (2012). Effect of brine composition and brining temperature on cheese physical properties in Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science*, 95(1), 460–470.
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2), 217-234.
- Gajbhiye, M. H., & Kapadnis, B. P. (2016). Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol science and technology*, 26(11), 1451-1470.
- Galaup, P., Gautier, A., Piriou, Y., De Villeblanche, A., Valla, A., & Dufossé, L. (2007). First pigment fingerprints from the rind of French PDO red-smear ripened soft cheeses Epoisses, Mont d'Or and Maroilles. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 373-378.
- Galaup, P., Sutthiwong, N., Leclercq-Perlat, M. N., Valla, A., Caro, Y., Fouillaud, M., ... & Dufossé, L. (2015). First isolation of *Brevibacterium* sp. pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 144-147.
- Galván, A. I., Hernández, A., Córdoba, M. de G., Martín, A., Serradilla, M. J., López-Corrales, M., & Rodríguez, A. (2022). Control of toxigenic *Aspergillus* spp. in dried

- figs by volatile organic compounds (VOCs) from antagonistic yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 376, 109772.
- Gálvez, A., Pulido, R. P., Abriouel, H., Omar, N. B., & Grande Burgos, M. J. (2012). Protective cultures. In *Decontamination of fresh and minimally processed produce*, (pp. 297-316). Wiley-Blackwell
- Gao, L. L., Zhang, Q., Sun, X. Y., Jiang, L., Zhang, R., Sun, G. Y., Zha, Y. L., & Biggs, A. R. (2013). Etiology of moldy core, core browning, and core rot of Fuji apple in China. *Plant Disease*, 97(4), 510-516.
- Garcha, S., & Natt, N. K. (2012). *In situ* control of food spoilage fungus using *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291. *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 643–648.
- García, M. V., Mallmann, C. A., & Copetti, M. V. (2018). Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Research International*, 106, 136–140.
- García-Benitez, C., Melgarejo, P., Sandin-España, P., Sevilla-Morán, B., & De Cal, A. (2019). Degrading enzymes and phytotoxins in *Monilinia* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 305-318.
- García-Bramasco, C. A., Blancas-Benitez, F. J., Montaña-Leyva, B., Medrano-Castellón, L. M., Gutierrez-Martinez, P., & González-Estrada, R. R. (2022). Influence of marine yeast *Debaryomyces hansenii* on antifungal and physicochemical properties of chitosan-based films. *Journal of Fungi*, 8(4), 369.
- García-Cela, E., Crespo-Sempere, A., Gil-Serna, J., Porqueres, A., & Marin, S. (2015). Fungal diversity, incidence and mycotoxin contamination in grapes from two agro-climatic Spanish regions with emphasis on *Aspergillus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8), 1716–1729.
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., ... & Lanciotti, R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*, 23(7), 641-648.

Bibliografía

- Garnier, L., Penland, M., Thierry, A., Maillard, M. B., Jardin, J., Coton, M., Leyva Salas, M., Coton, E., Valence, F., & Mounier, J. (2020). Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 322, 108574.
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017^a). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, 5(3), 42.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017^b). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197.
- George, M. (2008). Freezing. In *Food biodeterioration and preservation* (pp. 55-65). Singapore: Blackwell Publisher.
- Ghanbari, R., Rezaie, S., Noorbakhsh, F., Khaniki, G. J., Soleimani, M., & Aghae, E. M. (2019). Biocontrol effect of *Kluyveromyces lactis* on aflatoxin expression and production in *Aspergillus parasiticus*. *FEMS Microbiology Letters*, 366(10), fnz114.
- Ghani, N. A., Sulaiman, J., Ismail, Z., Chan, X. Y., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2014). *Rhodotorula mucilaginosa*, a quorum quenching yeast exhibiting lactonase activity isolated from a tropical shoreline. *Sensors*, 14(4), 6463-6473.
- Gherbawy, Y., & Shebany, Y. (2018). Mycobiota, total aflatoxins and ochratoxin a of cardamom pods. *Food Science and Technology Research*, 24(1), 87–96.
- Giannoglou, M., Koumandraki, H., Andreou, V., Dermesonlouoglou, E., Katsaros, G., & Taoukis, P. (2020). Combined osmotic and air dehydration for the production of shelf-stable white cheese. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 1435-1446.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortés, L., González-Jaén, M. T., & Vázquez, C. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 113-118.

- Giuffrida, D., Sutthiwong, N., Dugo, P., Donato, P., Cacciola, F., Girard-Valenciennes, E., ... & Dufossé, L. (2016). Characterisation of the C50 carotenoids produced by strains of the cheese-ripening bacterium *Arthrobacter arilaitensis*. *International Dairy Journal*, 55, 10-16.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Glenn, A. E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4), 213-240.
- Gnonlonfin, G. J. B., Adjovi, Y. C., Tokpo, A. F., Agbekponou, E. D., Ameyapoh, Y., de Souza, C., Brimer, L., & Sanni, A. (2013). Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. *Food Control*, 34(1), 115-120.
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Poulos, P. G. (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 11-19.
- Godana, E. A., Yang, Q., Wang, K., Zhang, H., Zhang, X., Zhao, L., Abdelhai, M. H., & Guillaume Legrand, N. N. (2020). Biocontrol activity of *Pichia anomala* supplemented with chitosan against *Penicillium expansum* in postharvest grapes and its possible inhibition mechanism. *LWT*, 124, 109188.
- Golonka, R., Yeoh, B. S., & Vijay-Kumar, M. (2019). The iron tug-of-war between bacterial siderophores and innate immunity. *Journal of Innate Immunity*, 11(3), 249-262.
- Golubev, W. I. (2013). A *Kluyveromyces lactis* mycocin active at neutral pH. *Microbiology*, 82(3), 290-294.
- Golubev, W. I., Pfeiffer, I., & Golubeva, E. W. (2006). Mycocin production in *Pseudozyma tsukubaensis*. *Mycopathologia*, 162(4), 313-316.

Bibliografía

- Gonzalez-Fandos, E., Sanz, S., & Olarte, C. (2000). Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Cameros cheese packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 17(4), 407–414.
- Gore-Lloyd, D., Sumann, I., Brachmann, A. O., Schneeberger, K., Ortiz-Merino, R. A., Moreno-Beltrán, M., *et al.*, & Freimoser, F. M. (2019). Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Molecular Microbiology*, 112(1), 317-332.
- Gori, K., Knudsen, P. B., Nielsen, K. F., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2011). Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 11(8), 643-652.
- Goulson, D. (2014). Pesticides linked to bird declines. *Nature*, 511(7509), 295-296.
- Gram, L. (2009). Microbiological spoilage of fish and seafood products. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, (pp. 87-119). Springer.
- Greger, V., & Schieberle, P. (2007). Characterization of the key aroma compounds in apricots (*Prunus armeniaca*) by application of the molecular sensory science concept. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5221-5228.
- Greguš, P., Vlčková, H., Buchta, V., Kestřanek, J., Křivčíková, L., & Nováková, L. (2010). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 674–681.
- Gripon, J. C. (1993). Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 2 Major Cheese Groups* (pp. 111-136). Boston, MA: Springer US.
- Grzegorzczak, M., Żarowska, B., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*, 61, 93–101.
- Guo, F. J., Ma, Y., Xu, H. M., Wang, X. H., & Chi, Z. M. (2013). A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie*

- van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103(4), 737–746.
- Guo, X., Qiao, M., Yang, Y., Luo, K., Liu, Z., Liu, J., ... & Sun, Q. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* M73 reduces postharvest decay and promotes anthocyanin accumulation in Tarocco blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 182, 111698.
- Gürses, M., Erdoğan, A., & Sert, S. (2004). Effect on aflatoxin formation of different storage conditions in tulum cheese inoculated with *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 28(1), 233-238.
- Guyard, C., Dehecq, E., Tissier, J. P., Polonelli, L., Dei-Cas, E., Cailliez, J. C., & Menozzi, F. D. (2002^a). Involvement of β -glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Molecular Medicine*, 8, 686-694.
- Guyard, C., Séguy, N., Cailliez, J. C., Drobecq, H., Polonelli, L., Dei-Cas, E., Mercenier, A., & Menozzi, F. D. (2002^b). Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 961–971.
- Guzzon, R., Carafa, I., Tuohy, K., Cervantes, G., Verneti, L., Barmaz, A., ... & Franciosi, E. (2017). Exploring the microbiota of the red-brown defect in smear-ripened cheese by 454-pyrosequencing and its prevention using different cleaning systems. *Food Microbiology*, 62, 160-168.
- Guzzon, R., Franciosi, E., & Larcher, R. (2014). A new resource from traditional wines: characterisation of the microbiota of “Vino Santo” grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *European Food Research and Technology*, 239(1), 117–126.
- Hammond, S. T., Brown, J. H., Burger, J. R., Flanagan, T. P., Fristoe, T. S., Mercado-Silva, N., Nekola, J. C., & Okie, J. G. (2015). Food spoilage, storage, and transport: Implications for a sustainable future. *BioScience*, 65(8), 758-768.

Bibliografía

- Harteveld, D. O. C., Akinsanmi, O. A., & Drenth, A. (2013). Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology*, *62*(2), 289-297.
- Hassan, Z. U., Al Thani, R., Atia, F. A., Alsafran, M., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2021). Application of yeasts and yeast derivatives for the biological control of toxigenic fungi and their toxic metabolites. *Environmental Technology & Innovation*, *22*, 101447.
- Hassanin, N. I. (1993). Detection of mycotoxigenic fungi and bacteria in processed cheese in Egypt. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *31*(1), 15–23
- Hayaloglu, A. A., & Kirbag, S. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kufllu cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *115*(3), 376–380.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V. P., Marjuoa, Y., Parker, J., & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, *114*(Suppl.1), 40–50.
- He, C., Zhang, Z., Li, B., Xu, Y., & Tian, S. (2019). Effect of natamycin on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*—Postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *151*, 134–141.
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., & Jany, J. L. (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology*, *116*(6), 692–705.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., & Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, *121*(2), 178-188.
- Hernández, A., Rodríguez, A., Córdoba, M. G., Martín, A., & Ruiz-Moyano, S. (2022). Fungal control in foods through biopreservation. *Current Opinion in Food Science*, 100904.

- Hernández-Montiel, L. G., Droby, S., Preciado-Rangel, P., Rivas-García, T., González-Estrada, R. R., Gutiérrez-Martínez, P., & Ávila-Quezada, G. D. (2021). A sustainable alternative for postharvest disease management and phytopathogens biocontrol in fruit: Antagonistic yeasts. *Plants*, *10*(12), 2641.
- Hernández-Montiel, L. G., Ochoa, J. L., Troyo-Diéguez, E., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*, *56*(2), 181–187.
- Hilber-Bodmer, M., Bünter, M., & Patocchi, A. (2010). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apricot in a Swiss orchard. *Plant Disease*, *94*(5), 643-643.
- Hocking, A. D. (2006). *Aspergillus* and related teleomorphs. In *Fungi and food spoilage*, 275-338. New York: Springer.
- Hocking, A. D., & Faedo, M. (1992). Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. *International Journal of Food Microbiology*, *16*(2), 123–130.
- Hoffmann, A., Franz, A., Walther, T., & Löser, C. (2023). Utilization of delactosed whey permeate for the synthesis of ethyl acetate with *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(5-6), 1635-1648.
- Hogan, D. A. (2006^a). Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Current biology*, *16*(12), R457-R458.
- Hogan, D. A. (2006^b). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic cell*, *5*(4), 613-619.
- Homer, C. M., Summers, D. K., Goranov, A. I., Clarke, S. C., Wiesner, D. L., Diedrich, J. K., Moresco, J. J., Toffaletti, D., Upadhya, R., Caradonna, I., Petnic, S., Pessino, V., Cuomo, C. A., Lodge, J. K., Perfect, J., Yates, J. R., Nielsen, K., Craik, C. S., & Madhani, H. D. (2016). Intracellular action of a secreted peptide required for fungal virulence. *Cell Host and Microbe*, *19*(6), 849–864.

Bibliografía

- Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316–1329.
- Horn, B. W., & Dorner, J. W. (2009). Effect of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on aflatoxin contamination of wounded peanut seeds inoculated with agricultural soil containing natural fungal populations. *Biocontrol Science and Technology*, 19(3), 249–262.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., & Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2982–2992.
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111–119.
- Hua, M. X., Chi, Z., Liu, G. L., Buzdar, M. A., & Chi, Z. M. (2010). Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*, 14(6), 515–521
- Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30(2), 71–78.
- Huang, C., Zhang, L., Johansen, P. G., Petersen, M. A., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2021). *Debaryomyces hansenii* strains isolated from Danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. *Frontiers in Microbiology*, 12, 662785.
- Huang, R., Che, H. J., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D. H., & Li, G. Q. (2012). Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biological Control*, 62(1), 53–63.

- Huang, R., Li, G. Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H. J., Jiang, D. H., & Huang, H. C. (2011). Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, *101*(7), 859–869.
- Huo, J. X., Bai, C. Y., Guo, L. H., & Zhao, Z. (2013). Effect of electron beam irradiation on the shelf life of mozzarella cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *66*(3), 352-358.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, *3*, 12.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J. L., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 437-456.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., & Comi, G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology*, *26*(1), 65–70.
- Ianiri, G., Idnurm, A., Wright, S. A. I., Durán-Patrón, R., Mannina, L., Ferracane, R., Ritieni, A., & Castoria, R. (2013). Searching for genes responsible for patulin degradation in a biocontrol yeast provides insight into the basis for resistance to this mycotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(9), 3101–3115.
- Inácio, R. S., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Queirós, R. P., & Saraiva, J. A. (2014). Effect of high-pressure treatments on microbial loads and physicochemical characteristics during refrigerated storage of raw milk Serra da Estrela cheese samples. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(5), 1272–1278.
- International Commission on Microbiological Specifications of Foods (ICMSF) (2005). T.A. Roberts, J.-L. Cordier, L. Gram, R.B. Tompkin, J.I. Pitt, L.G.M. Gorris, *et al.* (Eds.), *Microorganisms in foods 6* (2nd ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA (2005), pp. 643-715

Bibliografía

- Ioannidis, A. G., Kerckhof, F. M., Riahi Drif, Y., Vanderroost, M., Boon, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., & Devlieghere, F. (2018). Characterization of spoilage markers in modified atmosphere packaged iceberg lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 1–13.
- Ippolito, A., & Nigro, F. (2000). Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19(8-10), 715-723.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., & Selamat, J. (2014). Aflatoxin M1 in milk from urban and rural farmhouses of Punjab, Pakistan. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(1), 17-20.
- Iqbal, S. Z., Asi, M. R., Mehmood, Z., Mumtaz, A., & Malik, N. (2017). Survey of aflatoxins and ochratoxin A in retail market chilies and chili sauce samples. *Food Control*, 81, 218–223.
- Iqbal, S. Z., Paterson, R. R. M., Bhatti, I. A., Asi, M. R., Sheikh, M. A., & Bhatti, H. N. (2010). Aflatoxin B1 in chilies from the Punjab region, Pakistan. *Mycotoxin Research*, 26(3), 205–209.
- Ismail, S. A. S. (2013). Control of xerophilic mould in traditional egyptian salted fish, “molouha.” *International Food Research Journal*, 20(4), 1827–1831.
- ISO, 1995. Spices and condiments: Botanical nomenclature. ISO 676.
- Ispir, A., & Toğrul, I. T. (2009). Osmotic dehydration of apricot: Kinetics and the effect of process parameters. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(2), 166–180.
- Izgu, D. A., Kepekci, R. A., & Izgu, F. (2011). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in planta* with Panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(1), 85–91.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2002). Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium

- modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 59-73.
- Jaibangyang, S., Nasanit, R., & Limtong, S. (2020). Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. *BioControl*, 65(3), 377–386.
- Jalili, M., Jinap, S., & Radu, S. (2010). Natural occurrence of ochratoxin a contamination in commercial black and white pepper products. *Mycopathologia*, 170(4), 251–258.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., & Alizadeh, A. (2011). A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin*, 41(1), 65–71.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Other food protection methods. *Modern Food Microbiology*, 457-470.
- Jeddi, M. Z., Yunesian, M., Gorji, M. E. hagh, Noori, N., Pourmand, M. R., & Khaniki, G. R. J. (2014). Microbial evaluation of fresh, minimally processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 32(3), 391–399.
- Jestoi, M. (2008). Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1), 21-49.
- Jeswal, P., & Kumar, D. (2015). Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin a, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Microbiology*, 1-8.
- Jiang, T., Chen, H., Gao, H., & Zhou, Z. (2017). Spoilage microorganisms in vegetables. In *Food Spoilage Microorganisms: Ecology and Control*. (pp. 53-73). CRC Press
- Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (2004). State of the art and challenges of post-harvest disease management in apples. In *Fruit and vegetable diseases*, (pp. 59-94). Springer.

Bibliografía

- Jo, W. S., Song, H. Y., Song, N. B., Lee, J. H., Min, S. C., & Song, K. Bin. (2014). Quality and microbial safety of 'Fuji' apples coated with carnauba-shellac wax containing lemongrass oil. *LWT: Food Science and Technology*, 55(2), 490–497.
- Jodral, M., Liñan, E., Acosta, I., Gallego, C., Rojas, F., & Bentabol, A. (1993). Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. *International journal of food microbiology*, 18(2), 171-4.
- Jonathan, S. G., & Esho, E. O. (2010). Fungi and aflatoxin detection in two stored oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*) from Nigeria. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(11), 1722–1730.
- Jones, R. J., Wescombe, P. A., & Tagg, J. R. (2011). Identifying new protective cultures and culture components for food biopreservation. In *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (pp. 3-26). Woodhead Publishing.
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., & Petersen, M. A. (2003). Light-induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13(2–3), 239–249.
- Kallinteri, L. D., Kostoula, O. K., & Savvaids, I. N. (2013). Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. *Food Microbiology*, 36(2), 176-181.
- Kamelamela, N., Zalesne, M., Morimoto, J., Robbat, A., & Wolfe, B. E. (2018). Indigo- and indirubin-producing strains of *Proteus* and *Psychrobacter* are associated with purple rind defect in a surface-ripened cheese. *Food Microbiology*, 76, 543-552.
- Kasahara, S., Inoue, S. Ben, Mio, T., Yamada, T., Nakajima, T., Ichishima, E., Furuichi, Y., & Yamada, H. (1994^a). Involvement of cell wall β -glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Letters*, 348(1), 27–32.
- Kasahara, S., Yamada, H., Mio, T., Shiratori, Y., Miyamoto, C., Yabe, T., Nakajima, T., Ichishima, E., & Furuichi², Y. (1994^b). Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae*

- gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits beta-glucan synthesis. *Journal of bacteriology*, 176(5), 1488-1499.
- Kaur, S., Kumar, V., Chawla, M., Cavallo, L., Poater, A., & Upadhyay, N. (2017). Pesticides curbing soil fertility: effect of complexation of free metal ions. *Frontiers in chemistry*, 5, 43.
- Ketabchi, S., Taghipour, M. A., & Sharzei, A. (2012). Identification of lime fruit surface colonizing bacteria antagonistic against the green mold (*Penicillium digitatum*) and comparison of biological control with heat treatment and chemical control. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 3(2), 287-292.
- Khaliq, G., Abbas, H. T., Ali, I., & Waseem, M. (2019). Aloe vera gel enriched with garlic essential oil effectively controls anthracnose disease and maintains postharvest quality of banana fruit during storage. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 60(5), 659–669.
- Kheireddine, A., Palmieri, D., Vitullo, D., Barberio, A., Zouaoui, M., De Curtis, F., Sadfi-Zouaoui N. & Lima, G. (2021). Characterization of new yeast isolates collected from different fruits in Tunisia and biocontrol activity against *Penicillium expansum* on apples. *Journal of Plant Pathology*, 103, 1169-1184.
- Kikoku, Y., Tagashira, N., & Nakano, H. (2008). Heat resistance of fungi isolated from frozen blueberries. *Journal of Food Protection*, 71(10), 2030–2035.
- Kim, W. K., Hwang, Y. S., & Yu, S. H. (2008). Two species of *Penicillium* associated with blue mold of yam in Korea. *Mycobiology*, 36(4), 217-221.
- Kim, W. K., Sang, H. K., Woo, S. K., Park, M. S., Paul, N. C., & Yu, S. H. (2007). Six species of *Penicillium* associated with blue mold of grape. *Mycobiology*, 35(4), 180-185.
- Kirk-Othmer. (2007). Food processing. In *Food and Feed Technology* (pp. 705-748). Wiley-Blackwell.

Bibliografía

- Klassen, R., Teichert, S., & Meinhardt, F. (2004). Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Molecular Microbiology*, 53(1), 263–273.
- Klein, M. N., & Kupper, K. C. (2018). Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. *Food Microbiology*, 69, 1-10.
- Kobiler, I., Shalom, Y., Roth, I., Akerman, M., Vinokur, Y., Fuchs, Y., & Prusky, D. (2001). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the incidence of side and stem end rots in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 23(1), 23–32.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 845.
- Kombrink, A., Sánchez-Vallet, A., & Thomma, B. P. H. J. (2011). The role of chitin detection in plant-pathogen interactions. *Microbes and Infection*, 13(14–15), 1168–1176.
- Kong, W. J., Liu, S. Y., Qiu, F., Xiao, X. H., & Yang, M. H. (2013). Simultaneous multi-mycotoxin determination in nutmeg by ultrasound-assisted solid-liquid extraction and immunoaffinity column clean-up coupled with liquid chromatography and on-line post-column photochemical derivatization-fluorescence detection. *Analyst*, 138(9), 2729–2739.
- Kong, W., Wei, R., Logrieco, A. F., Wei, J., Wen, J., Xiao, X., & Yang, M. (2014). Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. *Food Chemistry*, 146, 320–326.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., & Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1595-1612.
- Kotan, R., Dikbas, N., & Bostan, H. (2009). Biological control of post-harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal of Biotechnology*, 8(2), 209–214.

- Koutchma, T., Popović, V., Ros-Polski, V., & Popielarz, A. (2016). Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 844-867.
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 14–19.
- Kure, C. F., Wasteson, Y., Brendehaug, J., & Skaar, I. (2001). Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1–2), 21–27.
- Kwon, J. H., Cheon, M. G., Kim, J. W., & Kwack, Y. B. (2011). Black rot of kiwifruit caused by *Alternaria alternata* in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), 298-298.
- Labuda, R., Hudec, K., Piecková, E., Mezey, J., Bohovič, R., Mátéová, S., & Lukáč, S. S. (2004). *Penicillium implicatum* causes a destructive rot of pomegranate fruits. *Mycopathologia*, 157, 217-223.
- Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., & Pandiella, S. S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food engineering*, 72(4), 332-338.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4(4), 433–440.
- Lahlali, R., Serrhini, M. N., & Jijakli, M. H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 315–322.
- Laitila, A., Kotaviita, E., Peltola, P., Home, S., & Wilhelmson, A. (2007). Indigenous microbial community of barley greatly influences grain germination and malt quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(1), 9-20.
- Langner, T., & Göhre, V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics*, 62(2), 243–254.

Bibliografía

- Lara, I., Camats, J. A., Comabella, E., & Ortiz, A. (2015). Eating quality and health-promoting properties of two sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars stored in passive modified atmosphere. *Food Science and Technology International*, 21(2), 133-144.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599-606.
- Leadley, C. E., & Williams, A. (2006). Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. In *Food processing handbook*, (pp. 201-235). Wiley-Blackwell.
- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Microbiological spoilage of dairy products. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, (pp. 41-67). Springer.
- Lee, H. J., & Ryu, D. (2017). Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food products: Public health perspectives of their co-occurrence. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(33), 7034-7051.
- León Peláez, A. M., Cataño, C. S., Yepes, E. Q., Villarroel, R. G., De Antoni, G. L. & Giannuzzi, L. (2012). Actividad inhibitoria del ácido láctico & acético sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* para la conservación de alimentos. *Control de alimentos*, 24(1-2), 177-183.
- Leroch, M., Kleber, A., Silva, E., Coenen, T., Koppenhöfer, D., Shmaryahu, A., Valenzuela, P. D. T., & Hahn, M. (2013). Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage. *Eukaryotic Cell*, 12(4), 614–626.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *Fusarium* laboratory workshops: A recent history. *Mycotoxin Research*, 22(2), 73–74.

- Lessard, M. H., Bélanger, G., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). The composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1813-1819.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., & Hsiang, T. (2012). Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control*, 61(2), 113–120.
- Li, Y. C., Bi, Y., & An, L. Z. (2007). Occurrence and latent infection of *Alternaria* rot of Pingguoli pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv. Pingguoli) fruits in Gansu, China. *Journal of phytopathology*, 155(1), 56-60.
- Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2016). Microbiological spoilage of foods and beverages. In *The stability and shelf life of food* (pp. 3-42). Woodhead Publishing.
- Lichter, A., Dvir, O., Ackerman, M., Feygenberg, O., & Pesis, E. (2004). Acidified peel of litchi fruits selects for postharvest *Penicillium* decay. *Phytoparasitica*, 32, 226-236.
- Lima, N., & Santos, C. (2017). MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. *Current Opinion in Food Science*, 13, 26–30.
- Lippolis, V., Irurhe, O., Porricelli, A. C. R., Cortese, M., Schena, R., Imafidon, T., Oluwadun, A., & Pascale, M. (2017). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in ginger (*Zingiber officinale*) from Nigeria. *Food Control*, 73, 1061–1067.
- Liu HM, Guo JH, Cheng YJ, Luo L, Liu P, Wang BQ., Deng B.X. & Long C.A. (2010^b) Control of gray mold of grape by *Hanseniaspora uvarum* and its effects on postharvest quality parameters. *Annals of microbiology*, 60, 31-35
- Liu, G. L., Chi, Z., Wang, G. Y., Wang, Z. P., Li, Y., & Chi, Z. M. (2015). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical reviews in biotechnology*, 35(2), 222-234.

Bibliografía

- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology*, *167*(2), 153-160.
- Liu, S. Q., & Tsao, M. (2009^a). Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control*, *20*(9), 852–855.
- Liu, S. Q., & Tsao, M. (2009^b). Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *International Journal of Food Microbiology*, *131*(2-3), 280-282.
- Liu, S., Zhang, D., Wang, Y., Yang, F., Zhao, J., Du, Y., Tian Z. & Long, C. (2022). Dimethyl dicarbonate as a food additive effectively inhibits *Geotrichum citri-aurantii* of citrus. *Foods*, *11*(15), 2328.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, G., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J. M., & Chai, J. (2012). Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science*, *336*(6085), 1160–1164.
- Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B., & Zheng, X. (2010^a). Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, *51*(1), 30–35.
- Liu, X., Grabherr, H. M., Willmann, R., Kolb, D., Brunner, F., Bertsche, U., Kühner, D., Franz-Wachtel, M., Amin, B., Felix, G., Ongena, M., Nürnberger, T., & Gust, A. A. (2014). Host-induced bacterial cell wall decomposition mediates pattern-triggered immunity in Arabidopsis. *ELife*, *3*, 1–24.
- Logesh, A. R., Pravinkuma, M., Raffi, S. M., & Kalaiselva, M. (2011). An investigation on microbial screening on salt dried marine fishes. *Journal of Food Resource Science*, *1*(1), 15–21.
- Logrieco, A., Moretti, A., & Solfrizzo, M. (2009). Alternaria toxins and plant diseases: An overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, *2*(2), 129–140.

- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., & Bottalico, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Mycotoxins in Plant Disease: Under the aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998-2003', EU project (QLK 1-CT-1998-01380), and ISPP 'Fusarium Committee'*, 597-609.
- Lone, M. A., Wani, M. R., Sheikh, S. A., Sahay, S., & Dar, M. S. (2012). Antagonistic potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Journal Biology, Agriculture and Healthcare*, 2224-3208.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., & Villa, T. G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(2), 141-144.
- Lopes, M. R., Klein, M. N., Ferraz, L. P., da Silva, A. C., & Kupper, K. C. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: A novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. *Microbiological Research*, 175, 93–99.
- Löser, C., Urit, T., Förster, S., Stukert, A., & Bley, T. (2012). Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch and chemostat cultivation at iron limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 685-696.
- Louw, J. P., & Korsten, L. (2014). Pathogenic *Penicillium* spp. on apple and pear. *Plant Disease*, 98(5), 590-598.
- Louw, J. P., & Korsten, L. (2015). Pathogenicity and host susceptibility of *Penicillium* spp. on citrus. *Plant Disease*, 99(1), 21-30.
- Lowes, K. F., Shearman, C. A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D. B., Merry, R. J., & Gasson, M. J. (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1066-1076.

Bibliografía

- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Cordero, M., Bernáldez, V., Reyes-Prieto, M., & Córdoba, J. J. (2015). Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Science*, *100*, 283–290.
- Lu, Y., & McMahon, D. J. (2015). Effects of sodium chloride salting and substitution with potassium chloride on whey expulsion of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *98*(1), 78–88.
- Lu, Y., Su, C., Unoje, O., & Liu, H. (2014). Quorum sensing controls hyphal initiation in *Candida albicans* through Ubr1-mediated protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(5), 1975–1980.
- Ludemann, V., Greco, M., Rodríguez, M. P., Basílico, J. C., & Pardo, A. G. (2010). Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. *LWT Food Science and Technology*, *43*(2), 315–318.
- Lugauskas, A., Repeckiene, J., & Novosinskas, H. (2005). Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *12*(2), 253-260.
- Lukša, J., Podoliankaite, M., Vepštaitė, I., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Urbonavičius, J., & Servienė, E. (2015). Yeast β -1,6-glucan is a primary target for the *Saccharomyces cerevisiae* K2 toxin. *Eukaryotic Cell*, *14*(4), 406–414.
- Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology*, *12*, 173–180.
- Luo, S., Wan, B., Feng, S., & Shao, Y. (2015). Biocontrol of postharvest anthracnose of mango fruit with *Debaryomyces nepalensis* and effects on storage quality and postharvest physiology. *Journal of food science*, *80*(11), M2555-M2563.
- Luo, Y., Zeng, K., & Ming, J. (2012). Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses. *Scientia Horticulturae*, *135*, 120–127.

- Luo, Y., Zhou, Y., & Zeng, K. (2013). Effect of *Pichia membranaefaciens* on ROS metabolism and postharvest disease control in citrus fruit. *Crop Protection*, *53*, 96–102.
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Rodriguez, M. E., Sosa, M. C., & Sangorrín, M. P. (2013). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*, *164*(2–3), 166–172.
- Ma, T., Wang, J., Wang, L., Yang, Y., Yang, W., Wang, H., Lan, T., Zhang, Q., & Sun, X. (2020). Ultrasound-combined sterilization technology: An effective sterilization technique ensuring the microbial safety of grape juice and significantly improving its quality. *Foods*, *9*(10), 1512.
- Macarisin, D., Bauchan, G., Droby, S., & Wisniewski, M. (2010). Novel role for reactive oxygen species (ROS) in host-antagonistic yeast-pathogen interactions in postharvest biocontrol systems. In *International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities 905* (pp. 113-119).
- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D., & Prajapati, J. B. (2016). Essential oils of herbs and spices: Their antimicrobial activity and application in preservation of food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *5*(5), 885–901.
- Madbouly, A. K., Elyousr, K. A. A., & Ismail, I. M. (2020). Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of brown rot of apple fruit, by using endophytic yeasts. *Biological control*, *144*, 104239.
- Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G. (2011). Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*, *28*(8), 1359–1380.
- Mageswari, A., Subramanian, P., Srinivasan, R., Karthikeyan, S., & Gothandam, K. M. (2015). Astaxanthin from psychrotrophic *Sphingomonas faeni* exhibits antagonism against food-spoilage bacteria at low temperatures. *Microbiological Research*, *179*, 38–44.

Bibliografía

- Majeed, B. H., Mohammed, R. R., & Rustum, A. N. (2019). Effect of black seed oil and aloe vera gel on banana fruit maturity and quality. *Plant Archives*, 19(2), 4459-4462.
- Makki, G. M., Kozak, S. M., Jencarelli, K. G., & Alcaine, S. D. (2021). Evaluation of the efficacy of commercial protective cultures to inhibit mold and yeast in cottage cheese. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 2709-2718.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8(7), 12–15.
- Mamgain A, Roychowdhury R, & Tah J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology (RJB)*, 1(1), 1–9.
- Mandeel, Q. A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159(2), 291–298.
- Manika, S., Swati, D., Dinesh, S. B., P, C., R, S., & Pratibha, S. (2013). Morphological, cultural, pathogenic and molecular studies of *Alternaria brassicae* infecting cauliflower and mustard in India. *African Journal of Microbiology Research*, 7(26), 3351–3363.
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: From ecological significance to application. *Critical reviews in biotechnology*, 39(5), 603-617.
- Manthey, F. A., Wolf-Hall, C. E., Yalla, S., Vijayakumar, C., & Carlson, D. (2004). Microbial loads, mycotoxins, and quality of durum wheat from the 2001 harvest of the northern plains region of the United States. *Journal of Food Protection*, 67(4), 772–780.
- Marcet-Houben, M., Ballester, A. R., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J. F., González-Candelas, L., & Gabaldón, T. (2012). Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC genomics*, 13(1), 1-18.
- March, J. C., & Bentley, W. E. (2004). Quorum sensing and bacterial crosstalk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(5), 495–502.

- Mareze, J., Ramos-Pereira, J., Santos, J. A., Beloti, V., & López-Díaz, T. M. (2022). Identification and characterisation of lactobacilli isolated from an artisanal cheese with antifungal and antibacterial activity against cheese spoilage and mycotoxigenic *Penicillium* spp. *International Dairy Journal*, 130, 105367.
- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M., & Neri, F. (2012^a). Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control*, 60(2), 132–140.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., & Bertolini, P. (2012^b). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 56–62.
- Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J. F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R. N., & Oulahal, N. (2007). Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1653-1661.
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2015). Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 565-572.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- Mariyono, J. (2008). Direct and indirect impacts of integrated pest management on pesticide use: a case of rice agriculture in Java, Indonesia. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(10), 1069-1073.
- Marquina, D., Barroso, J., Santos, A., & Peinado, J. M. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiological research*, 156(4), 387-391.
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5, 65-71.

Bibliografía

- Martelli, F., Bancalari, E., Neviani, E., & Bottari, B. (2020). Novel insights on pink discoloration in cheese: The case of Pecorino Toscano. *International Dairy Journal*, 111, 104829.
- Martín, A., Aranda, E., Benito, M. J., Pérez-Nevado, F., & Córdoba, M. G. (2005). Identification of fungal contamination and determination of mycotoxigenic molds by micellar electrokinetic capillary chromatography in smoked paprika. *Journal of Food Protection*, 68(4), 815–822.
- Martín, A., Córdoba, J. J., Núñez, F., Benito, M. J., & Asensio, M. A. (2004). Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 55–66.
- Martin, N. H., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 3176-3183.
- Martin, N. H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2021). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1251–1261.
- Martínez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2011). Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 41-54.
- Martínez-Absalón, S., Rojas-Solís, D., Hernández-León, R., Prieto-Barajas, C., Orozco-Mosqueda, M. del C., Peña-Cabriales, J. J., Sakuda, S., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 24(12), 1349–1362.
- Martini, C., & Mari, M. (2014). *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (Monilinia rot, brown rot). In *Postharvest decay* (pp. 233-265). Academic Press.
- Martín-Sánchez, A. M., Chaves-López, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. Á. (2011). Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a

- Spanish fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Science*, 89(1), 35–44.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839.
- Mathavi, V., Sujatha, G., Ramya, S. B., & Devi, B. K. (2013). New trends in food processing. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 5(2), 176–187.
- Mathot, A. G., Postollec, F., & Leguerinel, I. (2021). Bacterial spores in spices and dried herbs: The risks for processed food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 840–862.
- Maxin, P., Weber, R. W. S., Pedersen, H. L., & Williams, M. (2012). Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot water dipping and rinsing. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 25–31.
- McCormack, P., Wildman, H. G., & Jeffries, P. (1995). The influence of moisture on the suppression of *Pseudomonas syringae* by *Aureobasidium pullulans* on an artificial leaf surface. *FEMS microbiology ecology*, 16(2), 159-165.
- McDonald, B. A. (2014). Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. *Tropical Plant Pathology*, 39(3), 191–196.
- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A. I., & Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control*, 97, 70-79.
- Medina-Córdova, N., Rosales-Mendoza, S., Hernández-Montiel, L. G., & Angulo, C. (2018). The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*, 121, 216-222.
- Meena, M., Prajapati, P., Ravichandran, C., & Sehrawat, R. (2021). Natamycin: a natural preservative for food applications—a review. *Food Science and Biotechnology*, 1-16.

Bibliografía

- Meftah, S., Abid, S., Dias, T., & Rodrigues, P. (2018). Effect of dry-sausage starter culture and endogenous yeasts on *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium nordicum* growth and OTA production. *LWT*, 87, 250–258.
- Mehmood, A., Liu, G., Wang, X., Meng, G., Wang, C., & Liu, Y. (2019). Fungal quorum-sensing molecules and inhibitors with potential antifungal activity: a review. *Molecules*, 24(10), 1950.
- Melgarejo, P., Calín-Sánchez, Á., Carbonell-Barrachina, Á. A., Martínez-Nicolás, J. J., Legua, P., Martínez, R., & Hernández, F. (2014). Antioxidant activity, volatile composition and sensory profile of four new very-early apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 85-94.
- Merchán, A. V., Ruiz-Moyano, S., Hernández, M. V., Benito, M. J., Aranda, E., Rodríguez, A., & Martín, A. (2022). Characterization of autochthonal yeasts isolated from Spanish soft raw ewe milk protected designation of origin cheeses for technological application. *Journal of Dairy Science*, 105(4), 2931-2947.
- Mesías, F. J., Martín, A., & Hernández, A. (2021). Consumers' growing appetite for natural foods: Perceptions towards the use of natural preservatives in fresh fruit. *Food Research International*, 150, 110749.
- Meyer, J. M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., ... & Palleroni, N. J. (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2745-2753.
- Middelbeek, E. J., Hermans, J. M. H., & Stumm, C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45, 437-450.
- Miedes, E., & Lorences, E. P. (2004). Apple (*Malus domestica*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits cell-wall hemicelluloses and xyloglucan degradation during *Penicillium expansum* infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7957-7963.

- Mielniczuk, E., & Skwaryło-Bednarz, B. (2020). Fusarium head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy*, *10*(4), 509.
- Mimee, B., Labbé, C., & Bélanger, R. R. (2009^a). Catabolism of flocculosin, an antimicrobial metabolite produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Glycobiology*, *19*(9), 995–1001.
- Mimee, B., Labbé, C., Pelletier, R., & Bélanger, R. R. (2005). Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(4), 1597–1599.
- Mimee, B., Pelletier, R., & Bélanger, R. R. (2009^b). *In vitro* antibacterial activity and antifungal mode of action of flocculosin, a membrane-active cellobiose lipid. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(3), 989–996.
- Misra, N. N., Pankaj, S. K., Walsh, T., O'Regan, F., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2014). In-package nonthermal plasma degradation of pesticides on fresh produce. *Journal of Hazardous Materials*, *271*, 33–40.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, *7*(9), 405-410.
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., & Roig, B. (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *International journal of environmental research and public health*, *8*(6), 2265-2303.
- Mohammadi, P., Tozlu, E., Kotan, R., & Şenol Kotan, M. (2017). Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science*, *53*(3), 134–143.
- Mohammed, M. E. A., Eissa, A. A., & Aleid, S. M. (2016). Application of pulsed electric field for microorganisms inactivation in date palm fruits. *Journal of Food and Nutrition Research*, *4*(10), 646–652.
- Molyneux, R. J., Mahoney, N., Kim, J. H., & Campbell, B. C. (2007). Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by phenolic natural products. *Natural products: essential resources for human survival*, (pp. 231-251).

Bibliografía

- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, *17*(2), 73-87.
- Montagna, M. T., Santacroce, M. P., Spilotros, G., Napoli, C., Minervini, F., Papa, A., & Dragoni, I. (2004). Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia*, *158*, 245-249.
- Montanha, P. F., Anater, A., Burchard, J. F., Luciano, F. B., Meca, G., Manyes, L., & Pimpão, C. T. (2018). Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology*, *111*, 494–502.
- Mookherjee, A., Bera, P., Mitra, A., & Maiti, M. K. (2018). Characterization and synergistic effect of antifungal volatile organic compounds emitted by the *Geotrichum candidum* PF005, an endophytic fungus from the eggplant. *Microbial Ecology*, *75*, 647-661.
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, *26*(2–3), 73–83.
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J. L., & Coton, E. (2016). Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology*, *56*, 69-79.
- Mounier, J., Monnet, C., Vallaey, T., Arditi, R., Sarthou, A. S., Hélias, A., & Irlinger, F. (2008). Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and environmental microbiology*, *74*(1), 172-181.
- Moure, M. C., Pérez Torrado, R., Garmendia, G., Vero, S., Querol, A., Alconada, T., & León Peláez, Á. (2023). Characterization of kefir yeasts with antifungal capacity against *Aspergillus* species. *International Microbiology*, *26*(2), 361–370.
- Movahedi, A., Aghaei-Dargiri, S., Barati, B., Kadkhodaei, S., Wei, H., Sangari, S., Yang, L., & Xu, C. (2022). Plant immunity is regulated by biological, genetic, and epigenetic factors. *Agronomy*, *12*(11), 2790.

- Moya, E. A. (2013). Fusarium crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 40(2), 235-252.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welti-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 969-985.
- Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S., & Hesham, A. E. L. (2020). Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1497-1510.
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Retuerto, M., Sikaroodi, M., Brown, R. E., Jurevic, R., ... & Ghannoum, M. A. (2014). Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathogens*, 10(3), e1003996.
- Munda, A., & Viršček Marn, M. (2010). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* affecting peach orchards in Slovenia. *Plant disease*, 94(9), 1166-1166.
- Mundada, M., Hathan, S., & Maske, S. (2011). Mass transfer kinetics during osmotic dehydration of pomegranate arils. *Journal of Food Science*, 76(1), e31–e39.
- Mushtaq, M., Sharfun-Nahar, A. M., & Hashimi, M. H. (2015). Screening of killer, sensitive and neutral phenotypes in yeasts using certain sensitive *Pichia* strains. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 12, 3-10.
- Muzaffar, S., Ahmad, M., Wani, S. M., Gani, A., Baba, W. N., Shah, U., Ashaf K., Masoodi F.A., Gani A. & Wani, T. A. (2016). Ultrasound treatment: effect on physicochemical, microbial and antioxidant properties of cherry (*Prunus avium*). *Journal of food science and technology*, 53, 2752-2759.
- Nájera, A. I., Nieto, S., Barron, L. J. R., & Albisu, M. (2021). A review of the preservation of hard and semi-hard cheeses: Quality and safety. *International journal of environmental research and public health*, 18(18), 9789.

Bibliografía

- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Assaf, L. R., Toro, M. E., De Figueroa, L. C., & Vazquez, F. (2015). Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 91-100.
- Nascimento, B. L., Delabeneta, M. F., Rosseto, L. R. B., Junges, D. S. B., Paris, A. P., Persel, C., & Gandra, R. F. (2020). Yeast Mycocins: a great potential for application in health. *FEMS Yeast Research*, 20(3), foaa016.
- Nazerian, E., & Alian, Y. M. (2013). Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus fruits decay in Iran. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4, (8)1839-1843.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.
- Ndraha, N., Hsiao, H. I., Vlajic, J., Yang, M. F., & Lin, H. T. V. (2018). Time-temperature abuse in the food cold chain: Review of issues, challenges, and recommendations. *Food Control*, 89, 12-21.
- Nemsa, I., Hernández, M. A., Lacasa, A., Porrás, I., García-Lidón, A., Cifuentes, D., Bouzid S., Ortuño A. & Del Río, J. A. (2012). Pathogenicity of *Alternaria alternata* on fruits and leaves of 'Fortune' mandarin (*Citrus clementina* × *Citrus tangerina*). *Canadian journal of plant pathology*, 34(2), 195-202.
- Neri, F., Donati, I., Veronesi, F., Mazzoni, D., & Mari, M. (2010). Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 109–117.
- Nešić, K., Habschied, K., & Mastanjević, K. (2021). Possibilities for the biological control of mycotoxins in food and feed. *Toxins*, 13(3), 198.
- Nguegwouo, E., Sone, L. E., Tchuenchieu, A., Tene, H. M., Mouchigam, E., Njayou, N. F., & Nama, G. M. (2018). Ochratoxin A in black pepper, white pepper and clove sold in yaoundé (Cameroon) markets: Contamination levels and consumers'

- practices increasing health risk. *International Journal of Food Contamination*, 5(1), 1–7.
- Nichol, A. W., Harden, T. J., & Tuckett, H. (1996). Browning defects in mould ripened cheese. *Food Australia*, 48(3), 136-138.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L., & Hornby, J. M. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3805-3813.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*, 4, 148.
- Nielsen, P. V., & Boer, E. D. (2004). Food preservatives against fungi. *Introduction to food-and airborne fungi*, (Ed. 7), 357-363.
- Nisiotou, A. A., & Nychas, G. J. E. (2007). Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2765–2768.
- Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 6951–6956.
- Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., Wang, S., & Liu, D. (2018). Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 5513.
- Noots, I., Delcour, J. A., & Michiels, C. W. (1999). From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Critical reviews in microbiology*, 25(2), 121-153.
- Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 181–196.

Bibliografía

- Núñez, F., Lara, M. S., Peromingo, B., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., & Andrade, M. J. (2015). Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiology*, *46*, 114–120.
- O'Brien, N. M., O'Connor, T. P., O'Callaghan, J., & Dobson, A. D. W. (2004). Toxins in cheese biogenic amines and mycotoxins in cheese: chemistry, physics and microbiology. In: *General Aspects, Vol. 1*, Elsevier Applied Science, Amsterdam, the Netherlands.
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *19*(2), 311-331.
- Odeyemi, O. A., Burke, C. M., Bolch, C. J. S., & Stanley, R. (2018). Evaluation of spoilage potential and volatile metabolites production by *Shewanella baltica* isolated from modified atmosphere packaged live mussels. *Food Research International*, *103*, 415–425.
- Odeyemi, O. A., Sani, N. A., Obadina, A. O., Saba, C. K. S., Bamidele, F. A., Abughoush, M., Asghar, A., Dongmo, F. F. D., Macer, D., & Aberoumand, A. (2019). Food safety knowledge, attitudes and practices among consumers in developing countries: An international survey. *Food Research International*, *116*, 1386–1390.
- O'donnell, K. (1993). Fusarium and its near relatives. In *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. International Wallingford, United Kingdom.
- Oktarina, H., Singleton, I., & Anthony-Babu, S. (2012). The effect of low level of ozone on growth and development of *Rhizopus* sp. *In vitro*. *Biologi Edukasi: Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 11–17.
- Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, *32*(1), 1–19.

- Oliveira, P. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food microbiology*, *37*, 78-95.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, *50*(1), 87–94.
- Ondejková, N., Hudecová, M., & Bacigálová, K. (2010). First report on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic. *Plant Protection Science*, *46*(4), 181.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Fernández, M., Casquete, R., & de Guía Córdoba, M. (2014). Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of ‘Torta del Casar’ cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *67*(3), 402-409.
- O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Kelly, A. L., Beresford, T. P., & Murphy, P. M. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and environmental microbiology*, *66*(11), 4890-4896.
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, *265*, 18–22.
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2014). Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biology and Technology*, *96*, 64–68.
- Ortiz-Lemus, J. F., Campoy, S., & Martín, J. F. (2021). Biological control of mites by xerophile *Eurotium* species isolated from the surface of dry cured ham and dry beef cecina. *Journal of Applied Microbiology*, *130*(3), 665–676.

Bibliografía

- Osborne, L. E., & Stein, J. M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International journal of food microbiology*, *119*(1-2), 103-108.
- Ostry, V., Malir, F., & Ruprich, J. (2013). Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, *5*(9), 1574–1586.
- Oufensou, S., Ul Hassan, Z., Balmas, V., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2023). Perfume Guns: Potential of yeast volatile organic compounds in the biological control of mycotoxin-producing fungi. *Toxins*, *15*(1), 45.
- Oyugi, E., & Buys, E. M. (2007). Microbiological quality of shredded Cheddar cheese packaged in modified atmospheres. *International journal of dairy technology*, *60*(2), 89-95.
- Ozbey, F., & Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, *28*(2), 354–361.
- Pacheco, I., Bassi, D., Eduardo, I., Ciacciulli, A., Pirona, R., Rossini, L., & Vecchiotti, A. (2014). Qtl mapping for brown rot (*Monilinia fructigena*) resistance in an intraspecific peach (*Prunus persica* L. Batsch) F1 progeny. *Tree Genetics and Genomes*, *10*(5), 1223–1242.
- Padder, S. A., Prasad, R., & Shah, A. H. (2018). Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological Research*, *210*, 51–58.
- Palou, L., Guardado, A., & Montesinos-Herrero, C. (2010). First report of *Penicillium* spp. and *Pilidiella granati* causing postharvest fruit rot of pomegranate in Spain. *New Disease Reports*, *22*(21), 2044-0588.
- Papavasileiou, A., Karaoglanidis, G. S., & Michailides, T. J. (2015). Intraspecific diversity of *Monilinia fructicola* and *M. laxa* populations from blossoms and fruit of different hosts in Greece. *Plant Disease*, *99*(10), 1353-1359.
- Parafati, L., Palmeri, R., Pitino, I., & Restuccia, C. (2022). Killer yeasts isolated from olive brines: Technological and probiotic aptitudes. *Food Microbiology*, *103*. 103950.

- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, *47*, 85–92.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*, *63*, 191–198.
- Pardo, J. M., & Niranjana, K. (2006). Freezing. In *Food processing handbook*, (pp. 125-145). Wiley-Blackwell.
- Patriarca, A. (2016). *Alternaria* in food products. *Current Opinion in Food Science*, *11*, 1–9.
- Patterson, M. F., Linton, M., & Doona, C. J. (2007). Introduction to high pressure processing of foods. *High pressure processing of foods*, 1-14.
- Peever, T. L., Ibanez, A., Akimitsu, K., & Timmer, L. W. (2002). Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, *92*(7), 794-802.
- Pellegrino, C., Gullino, M. L., Garibaldi, A., & Spadaro, D. (2009). First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease*, *93*(6), 668-668.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*, *36*(2), 96–136.
- Perez, M. F., Contreras, L., Garnica, N. M., Fernández-Zenoff, M. V., Farías, M. E., Sepulveda, M., Ramallo, J., & Dib, J. R. (2016). Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PLoS ONE*, *11*(10), e0165590.
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Mattarelli, P., Modesto, M., Cilli, E., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2018). Intraspecies polymorphisms of *Kluyveromyces marxianus* strains from Yaghnob valley. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(6), fny028.

Bibliografía

- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2019). Cell wall surface properties of *Kluyveromyces marxianus* strains from dairy-products. *Frontiers in microbiology*, 10, 79.
- Perrone, G., & Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic fungi: Methods and protocols*, 33-49.
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). *Penicillium* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, 107-119.
- Perrone, G., Rodriguez, A., Magistà, D., & Magan, N. (2019). Insights into existing and future fungal and mycotoxin contamination of cured meats. *Current Opinion in Food Science*, 29, 20–27.
- Perrone, G., Samson, R. A., Frisvad, J. C., Susca, A., Gunde-Cimerman, N., Epifani, F., & Houbraeken, J. (2015). *Penicillium salamii*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 91–98.
- Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., & Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97, 85–93.
- Peter, K. V., & Babu, K. N. (2012). Introduction to herbs and spices: medicinal uses and sustainable production. In *Handbook of herbs and spices* (pp. 1-16). Woodhead Publishing.
- Peyro, H., Abbas Mirjalili, S., & Kavooosi, B. (2017). Effect of salicylic acid and aloe vera gel on postharvest quality of table grapes (*Vitis vinifera*). *Trakia Journal of Science*, 15(2), 154–159.
- Pfeiffer, P., & Radler, F. (1984). Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K 2. *Archives of Microbiology*, 137, 357-361.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., & Pócsi, I. (2015). Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 55(7), 805–818.

- Philippe, S., Souaïbou, F., Guy, A., Sébastien, D. T., Boniface, Y., Paulin, A., ... & Dominique, S. (2012). Chemical Composition and Antifungal activity of Essential oil of Fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six Mycotoxigenic Fungi isolated from traditional cheese wagashi. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(4), 22-27.
- Pianetti, A., Sabatini, L., Citterio, B., Pierfelici, L., Ninfali, P., & Bruscolini, F. (2008). Changes in microbial populations in ready-to-eat vegetable salads during shelf-life. *Italian Journal of Food Science*, 20(2), 245-254.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., & Gullino, M. L. (1997). Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 131–140.
- Pickova, D., Ostry, V., Malir, J., Toman, J., & Malir, F. (2020). A review on mycotoxins and microfungi in spices in the light of the last five years. *Toxins*, 12(12), 789.
- Pietri, A., Leni, G., Mulazzi, A., & Bertuzzi, T. (2022). Ochratoxin A and Sterigmatocystin in Long-Ripened Grana Cheese: Occurrence, Wheel Rind Contamination and Effectiveness of Cleaning Techniques on Grated Products. *Toxins*, 14(5), 306
- Pimentel, D. (2005). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, development and sustainability*, 7, 229-252.
- Pinkas, J. M., Battista, K., & Morille-Hinds, T. (2009). Microbiological spoilage of spices, nuts, cocoa, and coffee. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, (pp. 325-350). Springer.
- Pintado, C. M. B. S., Ferreira, M. A. S. S., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240–246.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009^a). The ecology of fungal food spoilage. In *Fungi and food spoilage*, 3-10. New York: Springer

Bibliografía

- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009^c). Zygomycetes. In *Fungi and food spoilage*, 145-168. New York: Springer
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009^d). Primary keys and miscellaneous fungi. In *Fungi and food spoilage*, 53-144. New York: Springer
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009^e). Spoilage of stored, processed and preserved foods. In *Fungi and food spoilage*, 401-422. New York: Springer
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009^b). *Penicillium* and related genera. In *Fungi and food spoilage*, 169-274. New York: Springer
- Pizzolitto, R. P., Armando, M. R., Combina, M., Cavaglieri, L. R., Dalcerro, A. M., & Salvano, M. A. (2012). Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47(10), 933–941.
- Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., Zadavec, M., Jaki, V., & Vulić, A. (2012). Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, 28(1), 94-98.
- Pocasangre, L., Sikora, R. A., Vilich, V., & Schuster, R. P. (2000). Survey of banana endophytic fungi from central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholus similis*). *InfoMusa*, 9(1), 3-5.
- Poniatowska, A., Michalecka, M., & Bielenin, A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 855–865.
- Porru, C., Rodríguez-Gómez, F., Benítez-Cabello, A., Jiménez-Díaz, R., Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., & Arroyo-López, F. N. (2018). Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. *Food Microbiology*, 69, 33–42.

- Pose, G. N., Ludemann, V., Fernandez, D., Segura, J. A., & Pinto, V. F. (2010). *Alternaria* species associated with 'moldy heart' on peaches in Argentina. *Tropical Plant Pathology*, 35, 174-177.
- Prado, G., Cruz Madeira, J. E. G., Morais, V. A. D., Oliveira, M. S., Souza, R. A., Peluzio, J. M., Godoy, J., Silva, J. F. M., & Piment, S. (2011). Reduction of Aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Protection*, 74(6), 1003–1006.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., & Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia microbiologica*, 63, 129-140.
- Prendes, L. P., Merín, M. G., Fontana, A. R., Bottini, R. A., Ramirez, M. L., & Morata de Ambrosini, V. I. (2018). Isolation, identification and selection of antagonistic yeast against *Alternaria alternata* infection and tenuazonic acid production in wine grapes from Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 14–20.
- Pretscher, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S., Schlander, M., Thines, E., & Claus, H. (2018). Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation*, 4(2), 31.
- Price, C. L., Parker, J. E., Warrilow, A. G., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2015). Azole fungicides: understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science*, 71(8), 1054–1058.
- Price, N. P., Bischoff, K. M., Leathers, T. D., Cossé, A. A., & Manitchotpisit, P. (2017). Polyols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. *Journal of Antibiotics*, 70(2), 136–141.
- Priest, F. G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics*, 1-16.

Bibliografía

- Pu, L., Jingfan, F., Kai, C., Chao-an, L., & Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Research*, *14*(4), 536–546.
- Qadri, O. S., Yousuf, B., & Srivastava, A. K. (2015). Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review. *Cogent Food & Agriculture*, *1*(1), 1121606.
- Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z., & Si, L. (2015). Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, *100*, 160–167.
- Quaglia, M., Moretti, C., Cerri, M., Linoci, G., Cappelletti, G., Urbani, S., & Taticchi, A. (2016). Effect of extracts of wastewater from olive milling in postharvest treatments of pomegranate fruit decay caused by *Penicillium adametzioides*. *Postharvest Biology and Technology*, *118*, 26–34.
- Quéro, L., Girard, V., Pawtowski, A., Tréguer, S., Weill, A., Arend, S., Cellière, B., Polsinelli, S., Monnin, V., van Belkum, A., Vasseur, V., Nodet, P., & Mounier, J. (2019). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiology*, *81*, 76–88.
- Quigley, L., O’Sullivan, D. J., Daly, D., O’Sullivan, O., Burdikova, Z., Vana, R., ... & Cotter, P. D. (2016). *Thermus* and the pink discoloration defect in cheese. *MSystems*, *1*(3), 10-1128.
- Rabosto, X., Carrau, M., Paz, A., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. M. (2006). Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and viticulture*, *57*(3), 332-338.
- Rahman, M. S., & Velez-Ruiz, J. F. (2007). Food preservation by freezing. In *Handbook of food preservation* (pp. 653-684). CRC press.

- Raja, M. M. M., Raja, A., Hajee, S. M., & Mohamed, A. S. (2012). Screening of bacterial compost from spoiled vegetables and fruits and their physiochemical characterization. *International Food Research Journal*, *19*(3), 1193.
- Ramos, B., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2013). Fresh fruits and vegetables: An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *20*, 1–15.
- Ramos-Pereira, J., Mareze, J., Patrino, E., Santos, J. A., & López-Díaz, T. M. (2019). Polyphasic identification of *Penicillium* spp. isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. *Food Microbiology*, *84*, 103253.
- Rathnayake, R. M. S. P., Savocchia, S., Schmidtke, L. M., & Steel, C. C. (2018). Characterisation of *Aureobasidium pullulans* isolates from *Vitis vinifera* and potential biocontrol activity for the management of bitter root of grapes. *European Journal of Plant Pathology*, *151*(3), 593–611.
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, *5*(4), 47–56.
- Reddy, K. R. N., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2010). Potential of patulin production by *Penicillium expansum* strains on various fruits. *Mycotoxin Research*, *26*, 257-265.
- Reis, R. F., De Goes, A., Mondal, S. N., Shilts, T., Brentu, F. C., & Timmer, L. W. (2006). Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant disease*, *90*(8), 1051-1054.
- Resa, C. P. O., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, *44*, 146-151.
- Roa, I., López, M. B., & Mendiola, F. J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, *32*(6), 413-419.

Bibliografía

- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems, 1*, 1-30.
- Rodríguez, A., Capela, D., Medina, Á., Córdoba, J. J., & Magan, N. (2015). Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of dry-cured sausage-based matrices. *International Journal of Food Microbiology, 194*, 71–77.
- Rodríguez-Aguilera, R., & Oliveira, J. C. (2009). Review of design engineering methods and applications of active and modified atmosphere packaging systems. *Food Engineering Reviews, 1*, 66-83.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and Environmental Microbiology, 77*(5), 1822–1832.
- Rodríguez-Pires, S., Melgarejo, P., De Cal, A., & Espeso, E. A. (2020). Proteomic studies to understand the mechanisms of peach tissue degradation by *Monilinia laxa*. *Frontiers in Plant Science, 11*, 1286.
- Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., & Bergamini, C. (2007). Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control, 18*(6), 697–701.
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (gray mold). In *Postharvest decay* (pp. 131-146). Academic Press.
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology, 113*, 69–76.
- Romani, S., Sacchetti, G., Pittia, P., Pinnavaia, G. G., & Dalla Rosa, M. (2002). Physical, chemical, textural and sensorial changes of portioned Parmigiano Reggiano cheese

- packed under different conditions. *Food science and technology international*, 8(4), 203-211.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 199–210.
- Rosa, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., Rampazzo, P. E., & Ceccato-Antonini, S. R. (2010). Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1491-1502.
- Roscoe, V., Lombaert, G. A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio, J., Kitchen, D., Kotello, S., Krakalovich, T., Trelka, R., & Scott, P. M. (2008). Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: A 3-year survey. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25(3), 347–355.
- Rotolo, C., Angelini, R. M. D. M., Dongiovanni, C., Fumarola, G., Carolo, M. Di, Perrelli, D., & Natale, P. (2018). Use of biocontrol agents and botanicals in integrated. *Pest Management Science*, 74(3), 715–725.
- Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoï-Matei, F., Alexandre, H., & Guilloux-Bénatier, M. (2014). Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38, 104–121.
- Ruiz-Moyano, S., Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A., & Córdoba, M. G. (2009). Characterization of molds isolated from smoked paprika by PCR-RFLP and micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food Microbiology*, 26(8), 776–782.
- Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Galvan, A. I., Córdoba, M. G., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Martín, A. (2020). Selection and application of antifungal VOCs-producing yeasts as biocontrol agents of grey mould in fruits. *Food Microbiology*, 92, 103556.

Bibliografía

- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., & Hernández, A. (2016). Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*, *57*, 45–53.
- Russo, P., Fares, C., Longo, A., Spano, G., & Capozzi, V. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity as a protective starter culture for bread production. *Foods*, *6*(12), 110.
- Sadok, I., Stachniuk, A., & Staniszevska, M. (2019). Developments in the monitoring of patulin in fruits using liquid chromatography: an overview. *Food Analytical Methods*, *12*(1), 76–93.
- Sage, L., Garon, D., & Seigle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(18), 5764–5768. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*
- Sahu, M., & Bala, S. (2017). Food processing, food spoilage and their prevention: An overview. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, *3*(1), 753–759.
- Saldaña, G., Álvarez, I., Condón, S., & Raso, J. (2014). Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(11), 1415–1426.
- Saleh, I., & Al-Thani, R. (2019). Fungal food spoilage of supermarkets' displayed fruits. *Veterinary World*, *12*(11), 1877–1883.
- Sanborn, M., Kerr, K. J., Sanin, L. H., Cole, D. C., Bassil, K. L., & Vakil, C. (2007). Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Canadian family physician*, *53*(10), 1712–1720.
- Santona, M., Sanna, M. L., Multineddu, C., Fancello, F., de la Fuente, S. A., Dettori, S., & Zara, S. (2018). Microbial biodiversity of Sardinian oleic ecosystems. *Food Microbiology*, *70*, 65–75.
- Santos, A., & Marquina, D. (2004^a). Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, *21*(2), 151–162.

- Santos, A., & Marquina, D. (2004^b). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, *150*(8), 2527–2534.
- Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., & Peinado, J. M. (2002). (1→6)-β-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(2), 95–99.
- Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., & Peinado, J. M. (2002). (1→6)-β-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(2), 95-99.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., & Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, *155*(2), 624–634.
- Santos, L., Marin, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2008). Capsicum and mycotoxin contamination: State of the art in a global context. *Food Science and Technology International*, *14*(1), 5–20.
- Sanzani, S. M., Reverberi, M., & Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, *122*, 95–105.
- Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, *49*(1), 121-128.
- Sardi, J. D. C. O., Pitangui, N. D. S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Revista Iberoamericana de Micología*, *31*(1), 22–29.

Bibliografía

- Sattin, E., Andreani, N. A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Novelli, E., ... & Cardazzo, B. (2016). Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discolouration. *Food Microbiology*, *57*, 8-15.
- Satya, Y., & Singh, V. (2014). Osmotic dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *51*, 1654–1673.
- Scheublin, T. R., Kielak, A. M., van den Berg, M., van Veen, J. A., & de Boer, W. (2020). Identification and antimicrobial properties of bacteria isolated from naturally decaying wood. *BioRxiv*, 2020-01.
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(3), 257–276.
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. In *Nature reviews. Microbiology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 212–221).
- Schwarz, P. B., Schwarz, J. G., Zhou, A., Prom, L. K., & Steffenson, B. J. (2001). Effect of *Fusarium graminearum* and *F. poae* infection on barley and malt quality. *Monatsschrift fur Brauwissenschaft*, *54*(3-4), 55-63.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, *22*(1), 36–42.
- Sellitto, V. M., Zara, S., Fracchetti, F., Capozzi, V., & Nardi, T. (2021). Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: Boundaries between pre-and postharvest applications on vegetables and fruits. *Fermentation*, *7*(2), 60.
- Sengun, I., Yaman, D., & Gonul, S. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, *1*(3), 291–298.
- Seo, Y. H., Jang, J. H., & Moon, K. D. (2010). Microbial evaluation of minimally processed vegetables and sprouts produced in Seoul, Korea. *Food Science and Biotechnology*, *19*, 1283-1288.

- Seol, K.-H., Yoo, J., Yun, J., Oh, M.-H., & Ham, un-S. (2019). Inhibitory activity of lactic acid bacteria against fungal spoilage. *Journal of Milk Science and Biotechnology*, 37(2), 83–93.
- Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., & Venâncio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110(8), 971–978.
- Serradilla, M. J., del Carmen Villalobos, M., Hernández, A., Martín, A., Lozano, M., & de Guía Córdoba, M. (2013). Study of microbiological quality of controlled atmosphere packaged ‘Ambrunés’ sweet cherries and subsequent shelf-life. *International journal of food microbiology*, 166(1), 85-92.
- Serradilla, M. J., Hernández, A., López-Corrales, M., Ruiz-Moyano, S., de Guía Córdoba, M., & Martín, A. (2016). Composition of the Cherry (*Prunus avium* L. and *Prunus cerasus* L.; Rosaceae). In *Nutritional composition of fruit cultivars* (pp. 127-147). Academic Press.
- Serradilla, M. J., Lozano, M., Bernalte, M. J., Ayuso, M. C., López-Corrales, M., & González-Gómez, D. (2011). Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of ‘Ambrunés’ sweet cherry cultivar. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 199-205.
- Serradilla, M. J., Martin, A., Hernandez, A., Lopez-Corrales, M., Lozano, M., & Córdoba, M. D. G. (2010). Effect of the commercial ripening stage and postharvest storage on microbial and aroma changes of ‘Ambrunés’ sweet cherries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 9157-9163.
- Serradilla, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., López-Corrales, M., & de Guía Córdoba, M. (2012). Physicochemical and sensorial characterisation of four sweet cherry cultivars grown in Jerte Valley (Spain). *Food Chemistry*, 133(4), 1551-1559.
- Serradilla, M. J., Moraga, C., Ruiz-Moyano, S., Tejero, P., Córdoba, M. D. G., Martín, A., & Hernández, A. (2021). Identification of the causal agent of aqueous spot

Bibliografía

- disease of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from the Jerte Valley (Cáceres, Spain). *Foods*, 10(10), 2281.
- Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U. C., & Bauer, F. (2012). The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One*, 7(12), e52609.
- Settanni, L., Sannino, C., Francesca, N., Guarcello, R., & Moschetti, G. (2012). Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(6), 606–614.
- Sever, Z., Ivić, D., Kos, T., & Miličević, T. (2012). Identification of *Fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 63(4), 463–470.
- Shah, M. A., & Khan, A. A. (2014). Imaging techniques for the detection of stored product pests. *Applied Entomology and Zoology*, 49(2), 201–212.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.
- Sharma, R., & Jangid, K. (2014). Fungal quorum sensing inhibitors. In *Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight* (pp. 237-257). New Delhi: Springer India.
- Sharma, S. (2015). Food preservatives and their harmful effects. *International journal of scientific and research publications*, 5(4), 1-2.
- Shenga, E., Singh, R. P., & Yadav, A. S. (2010). Effect of pasteurization of shell egg on its quality characteristics under ambient storage. *Journal of Food Science and Technology*, 47(4), 420–425.
- Shi, C., & Maktabdar, M. (2022). Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products—A review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 819684.

- Shtienberg, D. (2012). Effects of host physiology on the development of core rot, caused by *Alternaria alternata*, in red delicious apples. *Phytopathology*, 102(8), 769-778.
- Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunbjerg, S. D., Bosma, E. F., McNair L. M., Beisel C.L. & Neves, A. R. (2020). Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products. *Applied and environmental microbiology*, 86(7), e02312-19.
- Simoncini, N., Virgili, R., Spadola, G., & Battilani, P. (2014). Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products. *Food Control*, 46, 160–167.
- Singh, D., & Sharma, R. R. (2018). Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. In *Postharvest disinfection of fruits and vegetables* (pp. 1-52). Academic Press.
- Sipiczki, M. (2023). Identification of antagonistic yeasts as potential biocontrol agents: Diverse criteria and strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 110360.
- Sivakumar, D., Zeeman, K., & Korsten, L. (2007). Effect of a biocontrol agent (*Bacillus subtilis*) and modified atmosphere packaging on postharvest decay control and quality retention of litchi during storage. *Phytoparasitica*, 35, 507-518.
- Sivaraman, G. K., & Sivam, V. (2015). Microbiological spoilage of dried fishes. *SSRN Electronic Journal*.
- Smilanick, J. L., Erasmus, A., & Palou, L. (2019). Citrus fruits. In *Postharvest pathology of fresh horticultural produce* (pp. 3-54). CRC Press.
- Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M. D., Jansen, A., Prevost, M. C., Latgé, J. P., Fink, G. R., Foster, K. R., & Verstrepen, K. J. (2008). FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*, 135(4), 726–737.
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018). The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85, 144-150.

Bibliografía

- Song, E., Xia, X., Su, C., Dong, W., Xian, Y., Wang, W., & Song, Y. (2014). Hepatotoxicity and genotoxicity of patulin in mice, and its modulation by green tea polyphenols administration. *Food and Chemical Toxicology*, *71*, 122–127.
- Soto-Muñoz, L., Taberner, V., de la Fuente, B., Jerbi, N., & Palou, L. (2020). Curative activity of postharvest GRAS salt treatments to control citrus sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii*. *International Journal of Food Microbiology*, *335*, 108860.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, *47*, 39-49.
- Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(2), 185–194.
- Spadaro, D., Amatulli, M. T., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). First report of *Penicillium glabrum* causing a postharvest fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*) in the Piedmont Region of Italy. *Plant Disease*, *94*(8), 1066-1066.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., & Gullino, M. L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, *24*(2), 123–134.
- Spotts, R. A., Cervantes, L. A., & Facticeau, T. J. (2002). Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and cold storage temperature. *Postharvest Biology and Technology*, *24*(3), 251-257.
- Spotts, R. A., Sanderson, P. G., Lennox, C. L., Sugar, D., & Cervantes, L. A. (1998). Wounding, wound healing and staining of mature pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *13*(1), 27–36.

- Stark, M. J., & Boyd, A. (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *The EMBO Journal*, 5(8), 1995-2002.
- Streekstra, H., Verkennis, A. E., Jacobs, R., Dekker, A., Stark, J., & Dijksterhuis, J. (2016). Fungal strains and the development of tolerance against natamycin. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 15-22.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, J. (2015). Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 2968-2975.
- Sun, K., Wang, Z., Zhang, X., Wei, Z., Zhang, X., Li, L., Fu Y., Gao J., Zhao X. & Wang, J. (2021). Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* induced by ca ascorbate against *Botrytis cinerea* in cherry tomato fruit and the possible mechanisms of action. *Microbiology spectrum*, 9(3), e01507-21.
- Sutthiwong, N., Sukdee, P., Lekhavat, S., & Dufossé, L. (2021). Identification of red pigments produced by cheese-ripening bacterial strains of *Glutamicibacter arilaitensis* using HPLC. *Dairy*, 2(3), 396-409.
- Suzuki, C., & Nikkuni, S. (1994). The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 3041-3046.
- Syamilah, N., Nurul Afifah, S., Effarizah, M. E., & Norlia, M. (2022). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in spices and mixed spices: A review. *Food Research*, 6, 30-46.
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2018). Food matters: fish, income, and food supply—a comparative analysis. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(1), 15-28.
- Taczman-Brückner, A., Mohácsi-Farkas, C., Balla, C., & Kiskó, G. (2005^b). Comparison of biocontrol activity of *Kluyveromyces lactis* with other yeast strains against *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 34(1), 71-80.

Bibliografía

- Taczman-Brückner, A., Mohácsi-Farkas, C., Balla, C., & Kiskó, G. (2005^a). Mode of action of *Kluyveromyces lactis* in biocontrol of *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 34(2), 153-160.
- Taczman-Brückner, A., Mohácsi-Farkas, C., Balla, C., & Kiskó, G. (2005). Mode of action of *Kluyveromyces lactis* in biocontrol of *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 34(2), 153-160.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.
- Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K., Sono, E., Nakamura, T., & Kato, I. (1991). Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation, and properties. *The Journal of Antibiotics*, 919–924.
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., & Ait Ben Aoumar, A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 1–17.
- Tančinová, D., Felšöciová, S., Rybárik, L., Mašková, Z., & Cíсарová, M. (2015). Colonization of grapes berries and cider by potential producers of patulin. *Potravinárstvo: Scientific Journal for Food Industry*, 9(1), 138-142.
- Taylor, T. M., Ravishankar, S., Bhargava, K., & Juneja, V. K. (2019). Chemical preservatives and natural food antimicrobials. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 705-731.
- Teichmann, B., Labbé, C., Lefebvre, F., Bölker, M., Linne, U., & Bélanger, R. R. (2011). Identification of a biosynthesis gene cluster for flocculosin a cellobiose lipid produced by the biocontrol agent *Pseudozyma flocculosa*. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1483–1495.
- Teixeira, A. (2006). Thermal processing of canned foods. In *Handbook of food engineering* (pp. 757-810). CRC Press.

- Tejada, L., Gómez, R., Vioque, M., Sánchez, E., Mata, C., & Fernández-Salguero, J. (2000). Effect of freezing and frozen storage on the sensorial characteristics of Los Pedroches, a Spanish ewe cheese. *Journal of Sensory Studies*, 15(3), 251-262.
- Tejada, L., Sánchez, E., Gómez, R., Vioque, M., & Fernández-Salguero, J. (2002). Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. *Journal of Food Science*, 67(1), 126-129.
- Tejero, P., Martín, A., Rodríguez, A., Galván, A. I., Ruiz-Moyano, S., & Hernández, A. (2021). *In vitro* biological control of *Aspergillus flavus* by *Hanseniaspora opuntiae* 1479 and *Hanseniaspora uvarum* 1793, producers of antifungal volatile organic compounds. *Toxins*, 13(9), 663.
- Thanushree, M. P., Sailendri, D., Yoha, K. S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2019). Mycotoxin contamination in food: An exposition on spices. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 69-80.
- Tian, Y. Q., Li, W., Jiang, Z. T., Jing, M. M., & Shao, Y. Z. (2018). The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism. *Food science and biotechnology*, 27, 95-105.
- Tilocca, B., Balmas, V., Hassan, Z. U., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2019). A proteomic investigation of *Aspergillus carbonarius* exposed to yeast volatilome or to its major component 2-phenylethanol reveals major shifts in fungal metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108265.
- Timmer, L. W., Akimitsu, K., Solel, Z. V. I., & Peever, T. L. (2003). *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. *Alternaria diseases of citrus-Novel pathosystems*, 1000-1014.
- Tiwari, R. B. (2005). Application of osmo-air dehydration for processing of tropical frepical fruits in rural areas. *Indian food industry*, 24(6), 62-69.
- Todaro, M., Palmeri, M., Cardamone, C., Settanni, L., Mancuso, I., Mazza, F., Scatassa, M. L., & Corona, O. (2018). Impact of packaging on the microbiological,

Bibliografía

- physicochemical and sensory characteristics of a “pasta filata” cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, 17, 85–90.
- Toffano, L., Fialho, M. B., & Pascholati, S. F. (2017). Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control*, 108, 77–82.
- Tokatlı, K., & Demirdöven, A. (2020). Effects of chitosan edible film coatings on the physicochemical and microbiological qualities of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 259, 108656.
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
- Tonti, S., Mandrioli, M., Nipoti, P., Pisi, A., Toschi, T. G., & Prodi, A. (2017). Detection of fumonisins in fresh and dehydrated commercial garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(32), 7000–7005.
- Torres, J. A., Chotyakul, N., Velazquez, G., Saraiva, J. A., & Perez Lamela, C. (2010). Integration of statistics and food process engineering: Assessing the uncertainty of thermal processing and shelf-life estimations. In *Actas del VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*.
- Tournas, V. H. (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(1), 33–44.
- Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1), 11–17.
- Tournas, V. H., Niazi, N. S., & Kohn, J. S. (2015). Fungal presence in selected tree nuts and dried fruits. *Microbiology insights*, 8, MBI-S24308.
- Tozlu, E., Kotan, M. Ş., Tekiner, N., Dikbaş, N., & Kotan, R. (2019). Biological control of postharvest spoilage in fresh mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) fruits using bacteria during storage. *Erwerbs-Obstbau*, 61(2), 157–164.

- Tralamazza, S. M., Piacentini, K. C., Iwase, C. H. T., & Rocha, L. de O. (2018). Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Current Opinion in Food Science*, 23, 57–63.
- Trkulja, V. (2000). Species of the genus *Colletotrichum* causers of bitter pit of apple fruit and possibilities of their control. *Biljni lekar*, 28(5), 354-362.
- Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernández, M. E. (2014). *Alternaria alternata* (black rot, black spot). In *Postharvest decay* (pp. 147-187). Academic Press.
- Tsai, P. W., Yang, C. Y., Chang, H. T., & Lan, C. Y. (2011). Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PloS one*, 6(3), e17755.
- Tsiotsias, A., Savvaidis, I., Vassila, A., Kontominas, M., & Kotzekidou, P. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese ‘Anthotyros.’ *Food Microbiology*, 19(2–3), 117–126.
- Ueasangkomsate, P., & Santiteerakul, S. (2016). A Study of Consumers’ Attitudes and Intention to Buy Organic Foods for Sustainability. *Procedia Environmental Sciences*, 34, 423–430.
- Urquhart, E. J., & Punja, Z. K. (2002). Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(3), 219–229.
- Van den Tempel, T., & Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International dairy journal*, 10(4), 263-270.
- Van der Walt, L., Spotts, R. A., Visagie, C. M., Jacobs, K., Smit, F. J., & McLeod, A. (2010). *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple. *Plant Disease*, 94(6), 666-675.

Bibliografía

- Van Leeuwen, M. R., Van Doorn, T. M., Golovina, E. A., Stark, J., & Dijksterhuis, J. (2010). Water-and air-distributed conidia differ in sterol content and cytoplasmic microviscosity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 366-369.
- Van Long, N. N., Joly, C., & Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 73-90.
- Van Mullem, J. J., Zhang, J., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2022). Using wild yeasts to modulate the aroma profile of low-alcoholic meads. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(4), 2173-2184.
- Vasić, M., Duduk, N., Vico, I., Rančić, D., Pajić, V., & Backhouse, D. (2016). Comparative study of *Monilinia fructigena* and *Monilia polystroma* on morphological features, RFLP analysis, pathogenicity and histopathology. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 15–30.
- Vega, B. & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular & tasa de crecimiento. *Métodos & herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 1, 17-25.
- Velázquez-Varela, J., Fito, P. J., & Castro-Giráldez, M. (2014). Thermodynamic analysis of salting cheese process. *Journal of Food Engineering*, 130, 36–44.
- Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., Konovalovas, A., Ežerskytė, D., Stanevičienė, R., Strazdaitė-žielienė, Ž., Serva, S., & Servienė, E. (2018). *Saccharomyces paradoxus* K66 killer system evidences expanded assortment of helper and satellite viruses. *Viruses*, 10(10), 564.
- Vilanova, L., Teixidó, N., Torres, R., Usall, J., & Viñas, I. (2012). The infection capacity of *P. expansum* and *P. digitatum* on apples and histochemical analysis of host response. *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), 360–367.
- Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., & Teixidó, N. (2014). Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 54–60.

- Villalba, M. L., Susana Sáez, J., del Monaco, S., Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 94–100.
- Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2013). Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), 835–845.
- Viterbo, A., & Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*, 676-693.
- Wafaa M, H., & Mostafa, A. E. S. (2012). Production and optimization of *Pseudomonas fluorescens* biomass and metabolites for biocontrol of strawberry grey mould. *American Journal of Plant Sciences*, 2012.
- Waheed, S., & Siddique, N. (2009). Evaluation of dietary status with respect to trace element intake from dry fruits consumed in Pakistan: a study using instrumental neutron activation analysis. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(4), 333-343.
- Wang W, Chi Z, Liu G, Buzdar MA, Chi Z, Gu Q (2009a) Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity. *Biometals*, 22:965–972.
- Wang, H., He, A., & Yang, X. (2018). Dynamics of microflora on conveyor belts in a beef fabrication facility during sanitation. *Food Control*, 85, 42–47.
- Wang, Q., Lai, T., Qin, G., & Tian, S. (2009). Response of jujube fruits to exogenous oxalic acid treatment based on proteomic analysis. *Plant and cell physiology*, 50(2), 230–242.
- Wang, X. F., Li, Z. A., Tang, K. Z., Zhou, C. Y., & Yi, L. (2010). First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China. *Plant Disease*, 94(3), 375-375.

Bibliografía

- Wang, X. X., Chi, Z., Peng, Y., Wang, X. H., Ru, S. G., & Chi, Z. M. (2012). Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiological Research*, 167(9), 558–563.
- Wang, X., Chi, Z., Yue, L., & Li, J. (2007). Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Current Microbiology*, 55(5), 396–401.
- Warzecha, T., Adamski, T., Kaczmarek, Z., Surma, M., Chełkowski, J., Wiśniewska, H., Krystkowiak K. & Kuczyńska, A. (2011). Genotype-by-environment interaction of barley DH lines infected with *Fusarium culmorum* (WG Sm.) Sacc. *Field Crops Research*, 120(1), 21-30.
- Weber, R. W. S., & Hahn, M. (2011). A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118(1), 17–25.
- Wei, W., & Clough, S. J. (2016). Sclerotinia sclerotiorum molecular aspects in plantpathogenic interactions. *RAPP Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 24, 174-89.
- Weiler, F., & Schmitt, M. J. (2003). Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS yeast research*, 3(1), 69-76.
- Wésolowski, M., Algeri, A., Goffrini, P., & Fukuhara, H. (1982). Killer DNA plasmids of the yeast *Kluyveromyces lactis*: I. Mutations affecting the killer phenotype. *Current Genetics*, 5, 191-197.
- Westall, S., & Filtenborg, O. (1998). Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology*, 15(2), 243–249.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

- Williams, A. G., & Withers, S. E. (2007). Tyrosine metabolism in pigment-forming *Yarrowia lipolytica* strains isolated from English and European speciality mould-ripened cheese exhibiting a brown discolouration defect. *International Journal of Dairy Technology*, 60(3), 165-174.
- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 425-441.
- Winzer, K., Hardie, K., & Williams, P. (2003). LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum. *Advance Applied Microbiology*, 53, 291.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(4), 245-258.
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., & Schena, L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3–10.
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S. A. M. I. R., Chalutz, E., El-Ghaouth, A., & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In *Biological control: A global perspective* (pp. 262-273). Wallingford UK: CABI.
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El-Ghaouth, & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In *Biological control: A global perspective* (pp. 262-273). Wallingford UK: CABI.
- Wogu, M., & Iyayi, A. (2011). Mycoflora of some smoked fish varieties in Benin City Nigeria. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management*, 4(1).
- Wolfe, B. E. (2016). *Geotrichum candidum*. Pages 311–313 in The Oxford Companion to Cheese. C. W. Donnelly, ed. Oxford University Press

Bibliografía

- Wongsuk, T., Pumeesat, P., & Luplertlop, N. (2016). Fungal quorum sensing molecules: role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of basic microbiology*, 56(5), 440-447.
- World Health Organization. (1990). *Public health impact of pesticides used in agriculture*. World Health Organization.
- Wu, C., Wang, Y., Ai, D., Li, Z., & Wang, Y. (2022). Biocontrol yeast T-2 improves the postharvest disease resistance of grape by stimulation of the antioxidant system. *Food Science & Nutrition*, 10(10), 3219-3229.
- Xu, B., Zhang, H., Chen, K., Xu, Q., Yao, Y., & Gao, H. (2013^a). Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. *Current Microbiology*, 67(2), 255–261.
- Xu, H., Nobile, C. J., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2013^b). Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PloS one*, 8(5), e63736.
- Yalcin, H. T., & Ucar, F. B. (2009). Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses. *Annals of microbiology*, 59, 477-483.
- Yang, H., Wang, L., Li, S., Gao, X., Wu, N., Zhao, Y., & Sun, W. (2021). Control of postharvest grey spot rot of loquat fruit with *Metschnikowia pulcherrima* E1 and potential mechanisms of action. *Biological Control*, 152, 104406.
- Yann, D., Didier, H., & Daniel, B. (2005). Utilisation of the experimental design methodology to reduce browning defects in hard cheeses technology. *Journal of Food Engineering*, 68(4), 481-490.
- Yeom, H. W., Streaker, C. B., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (2000). Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4597-4605.
- Yousuf, B., & Srivastava, A. K. (2017). Flaxseed gum in combination with lemongrass essential oil as an effective edible coating for ready-to-eat pomegranate arils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1030–1038.

- Yousuf, O., Alam, I., Bhat, M. I., & Titikshya, S. (2018). Assessment of microbial spoilage and techniques to avert the deterioration in fruits and vegetables. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 2230–2235.
- Yu, T., Wang, L., Yin, Y., Wang, Y., & Zheng, X. (2008). Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 44–48.
- Zaied, C., Abid, S., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., & Bacha, H. (2010). Ochratoxin A levels in spices and dried nuts consumed in Tunisia. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 3(1), 52–57.
- Zain, M. E., Awaad, A. S., Razak, A. A., Maitland, D. J., Khamis, N. E., & Sakhawy, M. A. (2009). Secondary metabolites of *Aureobasidium pullulans* isolated from Egyptian soil and their biological activity. *Journal Applied Science Research*, 5, 1582-1591.
- Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*, 10(1), 42.
- Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*, 10(1), 42.
- Zang, J., Xu, Y., Xia, W., Jiang, Q., Yang, F., & Wang, B. (2018). Phospholipid molecular species composition of Chinese traditional low-salt fermented fish inoculated with different starter cultures. *Food Research International*, 111, 87–96.
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, S. (2020). Yeast biofilm in food realms: Occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-10.
- Żarowska, B., Wojtatowicz, M., Polomska, X., Juszczak, P., & Chrzanowska, J. (2004). Factors affecting killer activity of some yeast species occurring in Rokpol cheese. *Folia Microbiologica*, 49, 713-717.
- Zeidan, R., Ul-Hassan, Z., Al-Thani, R., Balmas, V., & Jaoua, S. (2018). Application of low-fermenting yeast *Lachancea thermotolerans* for the control of toxigenic fungi

Bibliografía

- Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium graminearum* and their mycotoxins. *Toxins*, 10(6), 242.
- Zeng, K., Deng, Y., Ming, J., & Deng, L. (2010). Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Scientia horticulturae*, 126(2), 223-228.
- Zhang, H., Du, H., & Xu, Y. (2021). Volatile organic compound-mediated antifungal activity of *Pichia* spp. and its effect on the metabolic profiles of fermentation communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(9), 1–15.
- Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., & Zheng, X. (2008). Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. *Biological control*, 47(1), 60-65.
- Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y., & Tian, S. (2020). Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *Journal of Fungi*, 6(3), 1–15.
- Zhao, J., Mou, Y., Shan, T., Li, Y., Zhou, L., Wang, M., & Wang, J. (2010). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, 15(11), 7961–7970.
- Zhao, L., Zhang, H., Lin, H., Zhang, X., & Ren, X. (2013^a). Effect of trehalose on the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* against post-harvest grey mould and blue mould decay of apples. *Pest Management Science*, 69(8), 983–989.
- Zhao, X., Schaffner, D. W., & Yue, T. (2013^b). Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: Point and probability risk assessments for aflatoxin B1. *Food Control*, 33(2), 366–377.
- Zhao, X., Yuan, Y., Zhang, X., & Yue, T. (2014). Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup. *Food Control*, 46, 332–337.
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., & Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 922450.

- Zheng, S., Chen, B., Qiu, X., Chen, M., Ma, Z., & Yu, X. (2016). Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China. *Chemosphere*, *144*, 1177–1192.
- Zheng, X., Zheng, L., Xia, F., Li, J., Zhou, W., Yuan, L., Rao S. & Yang, Z. (2023). Biological control of blue mold rot in apple by *Kluyveromyces marxianus* XZ1 and the possible mechanisms of action. *Postharvest Biology and Technology*, *196*, 112179.
- Zhimo, V. Y., Kumar, A., Biasi, A., Salim, S., Feygenberg, O., Toamy, M. A., Abdelfattaah, A., Medina, S., Freilich, S., Wisniewski, M., & Droby, S. (2021). Compositional shifts in the strawberry fruit microbiome in response to near-harvest application of *Metschnikowia fructicola*, a yeast biocontrol agent. *Postharvest Biology and Technology*, *175*, 111469.
- Zhou, X., Zhao, J., Li, Z., Lan, J., Li, Y., Yang, X., & Wang, D. (2016). Influence of ultrasound enhancement on chlorine dioxide consumption and disinfection by-products formation for secondary effluents disinfection. *Ultrasonics sonochemistry*, *28*, 376-381.
- Zhou, Y., Li, W., Zeng, J., & Shao, Y. (2018). Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. *Biological Control*, *123*, 111–119.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., & Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, *62*(3), 611-623.
- Zoffoli, J. P., Toivonen, P., & Wang, Y. (2017). 19 Postharvest Biology and Handling for Fresh Markets. *Cherries: Botany, production and uses*, 460.
- Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., & Raspor, P. (2013). Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(10), 2496–2505.

ANEXO: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

XI. Anexo: Producción científica

En este apartado se pretende señalar la producción científica que se ha realizado durante la realización de esta Tesis Doctoral. Cada apartado de la producción científica lleva la justificación asociada. Este anexo se divide en 4 parte

- Artículos publicados en JCR.
- Presentaciones en congresos.
- Premios recibidos.
- Colaboraciones científicas.

XI.1 Artículos científicos publicados

Artículo 1. Cabañas, C. M., Hernández, A., Martínez, A., Tejero, P., Vázquez-Hernández, M., Martín, A., & Ruiz-Moyano, S. (2020). Control of *Penicillium glabrum* by indigenous antagonistic yeast from vineyards. *Foods*. 9(12), 1864.



Article

Control of *Penicillium glabrum* by Indigenous Antagonistic Yeast from Vineyards

Catalina M. Cabañas ^{1,2}, Alejandro Hernández ^{1,2,*}, Ana Martínez ^{1,2}, Paula Tejero ^{1,2}, María Vázquez-Hernández ^{1,2}, Alberto Martín ^{1,2} and Santiago Ruiz-Moyano ^{1,2}

¹ Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007 Badajoz, Spain; ccabaasc@alumnos.unex.es (C.M.C.); amartinehi@alumnos.unex.es (A.M.); patejero@gmail.com (P.T.); m.vazquez.hern@gmail.com (M.V.-H.); amartin@unex.es (A.M.); srmsh@unex.es (S.R.-M.)

² Instituto Universitario de Investigación en Recursos Agrarios (INURA), Avd. de la Investigación s/n, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz, Spain

* Correspondence: ahernandez@unex.es

Received: 29 October 2020; Accepted: 9 December 2020; Published: 14 December 2020



Abstract: Biocontrol is one of the most promising alternatives to synthetic fungicides for food preservation. *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, and *Aspergillus* section *Nigri* are the most concerning pathogens for grape development. However, frequently, other species, such as *Penicillium glabrum* in this study, are predominant in spoiled bunches. In this work, 54 native yeasts from vineyards were screened by direct confrontation in potato dextrose agar plates as antagonists against *P. glabrum*. Isolates of *Pichia terricola*, *Aureobasidium pullulans*, and *Zygoascus meyeriae* were selected for their antagonist activity in vitro, plus isolates of *Pichia kudriavzevii*, *Hormonema viticola*, and *Hanseniaspora uvarum* were used as negative controls. However, in vivo, confrontations in wounded grapes showed disagreement with direct confrontation in vitro. *P. terricola*, *P. kudriavzevii*, *H. viticola*, *Z. meyeriae*, and *H. uvarum* significantly reduced the incidence of *P. glabrum* on grapes. Nevertheless, *P. terricola*, *H. viticola*, and *H. uvarum* themselves spoiled the wounded grapes. Inhibitions were associated with different mechanisms such as the production of volatile organic compounds (VOCs), lytic enzymes, biofilm formation, and competition for nutrients. The isolates of *P. kudriavzevii* L18 (a producer of antifungal VOCs which completely inhibited the incidence of *P. glabrum*) and *Z. meyeriae* L29 (with pectinase, chitinase and β -glucanase activity and biofilm formation which reduced 70% of the incidence of *P. glabrum*) are proposed as suitable biocontrol agents against *P. glabrum*.

Keywords: biocontrol; grapes; mechanism of action; volatile organic compounds; *Penicillium*

1. Introduction

A vineyard environment is a microbiologically complex ecosystem that harbors a wide variety of species of bacteria, yeast, and filamentous fungi [1]. Factors such as grape varieties, the stage of maturation, cultural practices, and climatic and geographical conditions define the diversity of the microbial population [2,3]. Among filamentous fungi, a relevant number of species have been described to spoil grapes or cause rotting of different parts of the plant. *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, and *Cladosporium cladosporioides*, together with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. are frequently isolated from different vineyards [2,4,5].

Botrytis cinerea, the causal agent of *Botrytis* bunch rot, is the most concerning pathogen in grapes [6,7]. This pathogen overwinters as mycelium, sclerotia and/or necrotic tissues, and in spring, with favorable weather conditions, a large number of conidia are produced, which are dispersed by wind or water [8]. *Botrytis* bunch rot has a large impact on the quality of grapes and wines. Chemical changes,

Artículo 2. Cabañas, C. M., Hernández, A., Serradilla, M. J., Moraga, C., Martín, A., Córdoba, M. D. G., & Ruiz-Moyano, S. (2023). Improvement of shelf-life of cherry (*Prunus avium* L.) by combined application of modified-atmosphere packaging and antagonistic yeast for long-distance export. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Research Article



Received: 9 December 2022

Revised: 22 February 2023

Accepted article published: 28 February 2023

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.12532

Improvement of shelf-life of cherry (*Prunus avium* L.) by combined application of modified-atmosphere packaging and antagonistic yeast for long-distance export

Catalina M. Cabañas,^{a,b} Alejandro Hernández,^{a,b*} Manuel J. Serradilla,^c Carlos Moraga,^{a,b} Alberto Martín,^{a,b} María de Guía Córdoba,^{a,b} and Santiago Ruiz-Moyano^{a,b}

Abstract

BACKGROUND: The last decade has seen a growing interest in reducing the use of chemical fungicides for postharvest decay control. In the research for new, safe alternatives, the combined application of biocontrol agents and passive modified-atmosphere packaging (MAP) has been shown to be a promising strategy to extend fruit quality. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of the combined application of MAP and two antagonistic yeasts, *Metschnikowia pulcherrima* L672 and *Pichia kudriavzevii* PK18, on sweet cherry shelf life.

RESULTS: Microbiological, physico-chemical, and quality fruit analysis from batches treated with antagonistic yeast were compared with a control batch without yeast application and a batch to which fludioxonil (Scholar®) was applied. The composition of the atmosphere and physico-chemical traits showed similar values among the different batches during cold storage. However, interestingly, the combination of MAP with the antagonistic yeasts *M. pulcherrima* L672 and *P. kudriavzevii* PK18 increases the control of microbiological spoilage with results comparable to the application of fludioxonil. In addition, these batches experienced a slight decrease in volatile compounds associated with fresh fruit aroma, whereas in the control batch an increase of altered fruit aromas was observed. The same effect of control of spoilage was observed during the shelf life period.

CONCLUSION: These results showed the positive effect of the combination of antagonistic yeasts and MAP, obtaining similar results in terms of control of microbiological spoilage and physico-chemical quality compared with the application of fludioxonil.

© 2023 The Authors. *Journal of The Science of Food and Agriculture* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry.

Keywords: biocontrol; postharvest pathogens; MAP; supply chain; quality

INTRODUCTION

Cherry (*Prunus avium* L.) is a non-climacteric fruit highly appreciated for its flavour characteristics, colour, and richness in nutrients and phytochemicals.^{1–4} At an optimal ripening stage, this fruit is characterised by a balance between soluble solid compounds and acidity, which together with colour have a decisive impact on consumer purchase and acceptance.⁵

Cultivar, harvesting time, handling, and packaging greatly affect the quality and shelf life (SL) of sweet cherry.⁶ However, its high perishability after harvest is mainly due to its high respiration rate, physico-chemical changes (such as weight loss, softening, darkening, mechanical damage, or pitting and bruising, etc.),^{7,8} and the development of spoilage microorganisms.⁹ Among them, primarily diverse species of filamentous fungi cause relatively faster spoilage after harvesting. The most important spoilage fungi of

sweet cherries are *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Monilinia* spp.^{10–13} Consequently, the SL of early cherry is limited

* Correspondence to: A. Hernández, Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007 Badajoz, Spain. E-mail: ahernandez@unex.es

a Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

b Instituto Universitario de Investigación en Recursos Agrarios (INURA), Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

c Área de Postcosecha, Instituto Tecnológico de Extremadura (INTAEX), Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Badajoz, Spain

© 2023 The Authors. *Journal of The Science of Food and Agriculture* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and

XI.2 Presentaciones en congresos

XXVIII Congreso Sociedad Española de Microbiología

Título del trabajo presentado: Selección de levaduras productoras de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos aisladas de viñedos

Tipo de trabajo: E-poster.



III Congreso Internacional de agroindustria, Ciencia y tecnología de los alimentos

Título del trabajo presentado: Selección de levaduras antagonistas frente a mohos alterantes de uva para vinificación.

Tipo de trabajo: Comunicación oral.



XI Congreso Nacional CyTA - CESIA

Título del trabajo presentado: Control de microorganismos alterantes en quesos mediante la aplicación de técnicas basadas en el control biológico

Tipo de trabajo: Comunicación oral.



XI Congreso Nacional CyTA - CESIA

Título del trabajo presentado: Control biológico de mohos alterantes en quesos de pasta blanda de Extremadura

Tipo de trabajo: Poster.



Ciencia e Innovación para la producción de alimentos Seguros, Saludables y Sostenibles

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN A:
Catalina Milagros Cabañas Cabezas

Por la presentación de la **comunicación póster:**
Control Biológico De Mohos Alterantes En Quesos De Pasta Blanda De Extremadura

Presentado en XI Congreso Nacional CyTA – CESIA. “Ciencia e Innovación para la producción de alimentos Seguros, Saludables y Sostenibles”, celebrado en Zaragoza los días 20, 21 y 22 de junio de 2022

Fdo.:  Pedro Marco Montori.
Secretario

Fdo.:  Susana Lorán Ayala.
Presidenta de Comité Organizador



Organiza:



IX Congreso Ibérico y XVII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas

Título del trabajo presentado: Ampliación de la vida útil cerezas mediante la combinación de atmósferas modificadas (MAP) y *Pichia kudriavzevii* Pk18

Tipo de trabajo: Comunicación oral.



CERTIFICADO

C.M. Cabañas, S. Ruiz-Moyano, M.J. Serradilla, C. Moraga, A. Martín, A. Hernández han presentado la comunicación ORAL **Ampliación de la vida útil de cerezas mediante la combinación de atmosferas modificadas (MAP) y *Pichia kudriavzevii* PK18** en el *IX Congreso Ibérico y XVII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*, celebrado en Mérida del 5 al 9 de junio de 2023.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Mérida a 9 de junio de 2023.

Manuel Joaquín Serradilla Sánchez
Presidente del Comité Científico

Ana Cristina Ramos
Co-presidente del Comité Organizador

XI.3 Premios recibidos

Premio al mejor e-poster del grupo de microbiología de los alimentos

Trabajo presentado: Selección de levaduras productoras de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos aislados de viñedos.

La Sociedad Española de Microbiología
con motivo de la celebración del
XXVIII Congreso Nacional de Microbiología
otorga el

XXVIII Congreso
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
MICROBIOLOGÍA

Premio del Grupo de Microbiología de los Alimentos al mejor e-poster a:

Catalina M. Cabañas

Por el trabajo titulado:

**Selección de levaduras productoras de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos
aisladas de viñedos**

El Presidente de la SEM



Antonio Ventosa
Madrid, 2 de Julio de 2021

Microbiología
de los Alimentos
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
MICROBIOLOGÍA

II puesto al Premio Cátedra AgroBank

Trabajo presentado: Control biológico de mohos alterantes en quesos de pasta blanda de Extremadura.



Universitat de Lleida
Càtedra AgroBank de
Qualitat i Innovació en
el Sector Agroalimentari

Av. Alcalde Rovira Roure, 191
E 25198 LLEIDA (Catalunya)
Tel.+ 34 973 70 23 35
catedragrobank@udl.cat
<http://www.catedragrobank.udl.cat>



Antonio J. Ramos Girona, Director de la Cátedra AgroBank “Calidad e Innovación en el Sector Agroalimentario”,

HACE CONSTAR

Que la Sra. Catalina Milagros Cabañas Cabezas, con su Trabajo Final de Máster titulado “Control biológico de mohos alterantes en quesos de pasta blanda de Extremadura”, quedó en segundo lugar en la II edición del Premio Cátedra AgroBank al mejor TFM convocado en 2021 dentro del programa “La Ciencia en Femenino”, sobre un total de 54 candidatas.

Y para que conste donde convenga, firmo el presente documento en Lleida, a la fecha de la firma electrónica.

Premio a la mejor comunicación oral de Posrecolección, Industria y Alimentación

Trabajo presentado: Ampliación de la vida útil de cerezas mediante la combinación de atmosferas modificadas (MAP) y *Pichia kudriavzevii* PK18



C E R T I F I C A D O

La Comunicación Oral **AMPLIACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE CEREZAS MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE ATMOSFERAS MODIFICADAS (MAP) Y *PICHIA KUDRIAVZEVII* PK18** presentada C.M. Cabañas, S. Ruiz-Moyano, M. J. Serradilla, C. Moraga, A. Martín, A. Hernández ha obtenido el **PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL** en la Sesión **Posrecolección, Industria y Alimentación** en el **IX Congreso Ibérico y XVII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas**, celebrado en Mérida del 5 al 9 de junio de 2023.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Mérida a 8 de junio de 2023.

Manuel Joaquín Serradilla Sánchez
Presidente del Comité Científico

Ana Cristina Ramos
Co-presidente del Comité Organizador

XI.4 Colaboraciones científicas

XI.4.1 Artículos

Artículo: Merchán, A. V., Ruiz-Moyano, S., Benito, M. J., Hernández, M. V., Cabañas, C. M., & Román, Á. C. (2023). Metabarcoding analysis reveals a differential bacterial community profile associated with ‘Torta del Casar’ and ‘Queso de la Serena’ PDO cheeses. *Food Bioscience*, 103491.



Metabarcoding analysis reveals a differential bacterial community profile associated with ‘Torta del Casar’ and ‘Queso de la Serena’ PDO cheeses

Almudena V. Merchán^{a,b}, Santiago Ruiz-Moyano^{a,b,*}, María José Benito^{a,b}, María Vázquez Hernández^{a,b}, Catalina M. Cabañas^{a,b}, Ángel Carlos Román^c

^a Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avda. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz, Spain

^b Instituto Universitario de Recursos Agrarios (INURA), Universidad de Extremadura, Avda. de la Investigación s/n, Campus Universitario, 06006, Badajoz, Spain

^c Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas s/n, 06071, Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Raw Ewe's milk cheese
'Torta del casar'
'Queso de la serena'
Microbiota
High-throughput sequencing
Lactic acid bacteria

ABSTRACT

A detailed understanding of the microbial ecology of artisanal cheeses is a crucial factor for implementation practices that can help to update their quality. In this study, the bacterial communities of Protected Designation of Origin (PDO) ‘Queso de la Serena’ and ‘Torta del Casar’ cheeses were characterised by 16S rRNA gene metabarcoding sequencing over 60 days of ripening at three dairies for each cheese variety. Both PDO cheeses presented a distinctive and unique bacterial community, suggesting that the manufacturing practices of each PDO shaped the microbiota. *Lactococcus lactis* and, to a lesser extent, *Leuconostoc mesenteroides* were the key lactic acid bacteria (LAB) species that drove the ripening process of PDO ‘Torta del Casar’, whereas in PDO ‘Queso de la Serena’, *Leu. mesenteroides* was the main LAB species, followed by *Lactococcus ruffinolactis* and *Lc. lactis*, depending on the dairy. Furthermore, a wide range of non-starter LAB, Gram-negative bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci were found, with a variable presence and abundance between dairies. In this regard, the dairy was a strong contributing factor to the variability in the composition of the bacterial community in each cheese type. In contrast, the impact of the ripening process was limited. Overall, this study enhances the understanding of the bacterial dynamics that occur during the ripening of these traditional PDO cheeses, highlighting the need to improve the standardisation of the raw materials and manufacturing practices to minimise inter-dairy variability, ensuring final quality and their unique sensory traits.

1. Introduction

The cheese microbiota plays a decisive role in the biochemical events that take place during the ripening process, thus contributing to the final sensory characteristics and quality or, conversely, causing potential spoilage and even safety issues (Afshari, Pillidge, Dias, Osborn, & Gill, 2018; Coelho, Malcata, & Silva, 2022). The cheese microbiome is strongly influenced by several factors such as cheese variety, dairy location, environment, surface and manufacturing conditions, type of milk and coagulant, heat treatments, use of starter cultures, and ripening conditions (Bokulich & Mills, 2013; De Filippis, Genovese, Ferranti, Gilbert, & Ercolini, 2016; Montel et al., 2014).

In the European Union, to protect the name and promote the unique characteristics of food products, a series of geographical indication (GI)

recognitions has been established. The GI for food products is the Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication. Artisanal cheeses are gaining popularity among consumers due to their unique sensory attributes (Colonna, Durham, & Meunier-Goddik, 2011). ‘Torta del Casar’ and ‘Queso de la Serena’ are both Spanish artisanal cheeses from the Autonomous Community of Extremadura (Spain) that have been granted the PDO quality label. They are characterised by a soft and spreadable paste-like texture and intense aroma and are highly appreciated by consumers. In the last decade, their sensory quality has been awarded by prestigious national (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) and international (World Cheese Awards) events. This has increased the sales of both cheeses. These PDO cheeses are made with raw ewe's milk, without starter cultures, using a dried flower infusion from *Cynara cardunculus* L. cardoon as a coagulant

* Corresponding author. Instituto Universitario de Recursos Agrarios (INURA), Universidad de Extremadura, Avda. de la Investigación s/n, Campus Universitario, 06006, Badajoz, Spain. srmsh@unex.es

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103491>

Received 31 October 2023; Received in revised form 30 November 2023; Accepted 14 December 2023
Available online 20 December 2023

2212-4292/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

XI.4.2 Presentaciones en congresos

XIII Congreso Nacional y XI Ibérico de Maduración y Postcosecha

Título del trabajo presentado: Control *in vitro* de *Aspergillus flavus* por *Hanseniaspora opuntiae* L479 y *Hanseniaspora uvarum* L793 productores de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos.

Tipo de trabajo: Poster.



POST2022
14-17 JUNIO 2022 ZARAGOZA

XIII Congreso Nacional y XI Ibérico
de Maduración y Postcosecha

LOS CO-PRESIDENTES DEL COMITÉ ORGANIZADOR CERTIFICAN

Que el trabajo titulado:

“Control in vitro de Aspergillus flavus por Hanseniaspora opuntiae L479 y Hanseniaspora uvarum L793, productores de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos”

Cuyo autor/es son:

Paula Tejero Cordero; Alberto Martín González; Catalina M. Cabañas Cabezas; María Ángeles Rivas Muñoz;
Alicia Rodríguez Jiménez

Ha sido presentado en el **XIII Congreso Nacional y XI Ibérico de Maduración y Postcosecha** celebrado en Zaragoza del 14 al 17 de junio de 2022.

ROSA ORIA ALMUDÍ

ESTHER ARIAS ÁLVAREZ

JESÚS VAL FALCÓN

ZARAGOZA 17 JUNIO 2022

XIII Congreso Nacional y XI Ibérico de Maduración y Postcosecha

Título del trabajo presentado: Caracterización de la población microbiana de cereza (*Prunus avium* L.) con síntomas de “*Mancha*” en el Valle del Jerte.

Tipo de trabajo: Poster.



POST2022
14-17 JUNIO 2022 ZARAGOZA

XIII Congreso Nacional y XI Ibérico
de Maduración y Postcosecha

LOS CO-PRESIDENTES DEL COMITÉ ORGANIZADOR CERTIFICAN

Que el trabajo titulado:

*“Caracterización de la población microbiana de cereza (*Prunus avium* L.) con síntomas de «Mancha» en el Valle del Jerte”*

Cuyo autor/es son:

Carlos Moraga Lozano; Manuel J. Serradilla Sánchez; Catalina M. Cabañas Cabezas; Almudena Vázquez;
Santiago Ruiz-Moyano Seco de Herrera

Ha sido presentado en el **XIII Congreso Nacional y XI Ibérico de Maduración y Postcosecha** celebrado en Zaragoza del 14 al 17 de junio de 2022.

ROSA ORIA ALMUDÍ

ESTHER ARIAS ÁLVAREZ

JESÚS VAL FALCÓN

ZARAGOZA 17 JUNIO 2022

XXII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Título del trabajo presentado: Evaluación de la contribución de las levaduras con propiedades tecnológicas, a las propiedades sensoriales de quesos de pasta blanda.

Tipo de trabajo: Comunicación oral.



CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

Se certifica mediante el presente documento que
**Santiago Ruiz-Moyano, Almudén Vázquez Merchán, Catalina Milagros Cabañas
Cabezas, Alicia Rodríguez Jiménez, Alberto Martín González**
ha/han presentado el póster titulado titulada
*“Evaluación de la contribución de levaduras con propiedades tecnológicas, a las
propiedades sensoriales de quesos de pasta blanda”*

en el XXII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos celebrado en Jaén
los días 12, 13, 14 y 15 de septiembre de 2022.

Jaén, 15 de septiembre de 2022

Antonio Gálvez del Postigo Ruiz
Presidente del Comité Organizador