



**Tecnologías alternativas para inhibir
el biodeterioro en productos
panificados envasados y
conservados a temperatura
ambiente**

Lic. Mariana Gonda

Tesis de Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias, UdelaR.

Octubre 2015

Directores de Tesis: Dra. Silvana Vero

Dra. Caterina Rufo

Asesor externo: Dr. Gastón Ares

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Silvana y Caterina, tutora y cotutora del presente trabajo. Muchas gracias por su dedicación, preocupación y paciencia a lo largo del trabajo, y por sobre todo por su calidez humana. Gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por ayudarme a crecer como investigadora y por permitirme formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Gastón Ares, quien en principio solo iba a colaborar con mi trabajo ayudándome a realizar los ensayos de análisis sensorial y terminó comprometiéndose como un tercer tutor. Gracias por tu tiempo y dedicación. También quiero agradecer a todo el grupo que trabaja con Gastón en Análisis sensorial, en especial a Ana, Felipe y Denise, quienes me ayudaron directamente en el trabajo.

A las instituciones que financiaron este proyecto. A la ANII, por otorgarme una beca de Maestría. A CSIC por financiar materiales utilizados en este proyecto mediante el programa de Iniciación a la Investigación. A Ana Olaso, quien me proporcionó los bizcochuelos para trabajar. Muchas gracias Ana por permitirme entrar a tu planta, por tu buena disposición, colaboración y compromiso con este trabajo. A Patricia Lema, quien me permitió utilizar el analizador de gases.

A todos los integrantes de la Cátedra de Microbiología, en particular a Gianna, quienes de una forma u otra han colaborado con mi trabajo y formación a lo largo de este tiempo. En especial, quiero agradecer a mis compañeras del laboratorio 14, un excelente grupo humano. Gracias muchachas por compartir mis risas, entender mis caras, escucharme y darme ánimo cuando lo necesité!

Agradecer a Giannina, Soledad y María Jesús del Laboratorio de Nutrición y Alimentos del Instituto Polo Tecnológico de Pando. Gracias por su disponibilidad, colaboración y por hacerme sentir parte del laboratorio.

Unas gracias especiales a mi amigo Gastón Rariz, quien fue que me contactó con Silvana para poder realizar este trabajo. Sin vos Tonga quizás esto no hubiese sido posible.

También quiero agradecer a aquellas personas que me acompañaron de una forma especial en la realización de este trabajo. A mis padres y a mis hermanos, gracias por siempre ser mi luz, por compartir mis alegrías, por estar presentes y animarme en los momentos difíciles, por creer en mí. A mis amigos, en especial a Vir, Isa, Noe, Mery, Shía, Be, Mauri, Juan y Alf, gracias por siempre impulsarme y acompañarme, por estar presentes. Al resto de mi familia, que sin entender mucho que es bien lo que hago siempre se preocupan y me acompañan.

RESUMEN

Los bizcochuelos son un tipo de panificado de consumo frecuente. Este producto tiene una vida útil corta debido al deterioro causado principalmente por microorganismos, en especial hongos. Este deterioro afecta a la calidad e inocuidad del bizcochuelo. El objetivo general del presente trabajo de tesis fue combinar estrategias de conservación para minimizar el biodeterioro fúngico de bizcochuelos almacenados a temperatura ambiente de forma de obtener una vida útil no menor a 3 semanas, utilizando el envasado en atmósfera modificada (ATM) como la principal estrategia.

Los hongos aislados como contaminantes de bizcochuelos pertenecieron a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Talaromyces*, siendo el género *Penicillium* el aislado con mayor frecuencia. El estudio de sensibilidad al crecimiento en ATM mostró que todos los aislamientos presentaron inhibición de crecimiento en ATM N₂:CO₂ 50:50, logrando inhibiciones entre 47% y 100%. La especie *P. crustosum*, aislada con mayor frecuencia, mostró una inhibición entre 32% y 40%, por lo cual se estudió la combinación de envasado en ATM con diferentes estrategias de conservación para impedir su crecimiento. Se logró una inhibición total del crecimiento en medio de cultivo combinando el uso de ATM con: 500 ppm de sorbato de potasio o disminuyendo la actividad de agua a valores menores que 0.91. A su vez, se estudió la capacidad de producción de la neurotoxina Penitrem A de la cepa aislada *P. crustosum* MG, la cual fue capaz de producir la neurotoxina en medio de cultivo, no produciéndola en el bizcochuelo.

Por otro lado, se estudió mediante un diseño factorial completo el efecto combinado de la atmósfera de envasado (aire o ATM), la adición de sorbato de potasio, el pH y el tiempo de almacenamiento sobre el crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos. El crecimiento se cuantificó por PCR en tiempo real, método que se puso a punto en el presente trabajo y para el cual se diseñaron primers específicos. Los factores significativos en el crecimiento de *P. crustosum* fueron la atmósfera de envasado y el tiempo de almacenamiento, concluyendo que el envasado en atmósfera modificada resulta una estrategia eficaz para inhibir por 30 días, el crecimiento de *P. crustosum* en el bizcochuelo. Finalmente se realizó un ensayo de evaluación sensorial con consumidores para estimar la vida útil del producto. Los resultados mostraron que la vida útil sensorial fue de 7 días, ya que a este tiempo fue rechazado por el 25% de los consumidores.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE TABLAS INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE TABLAS INDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- Bizcochuelo, un producto panificado.....	1
1.2- Biodeterioro de productos panificados.....	2
1.3- Hongos causantes de biodeterioro, productores de micotoxinas.....	5
1.4- Factores que afectan el crecimiento de los hongos causantes de biodeterioro de productos panificados.....	7
1.4.1- Actividad de agua.....	7
1.4.2- Concentración de H ⁺ (pH).....	8
1.4.3- Conservantes.....	8
1.4.4- Temperatura de almacenamiento.....	9
1.4.5- Condiciones de envasado.....	10
1.5- Combinación de diferentes estrategias para inhibir el crecimiento fúngico.....	12
1.6- Métodos de cuantificación de crecimiento fúngico.....	12
1.7- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.....	14
1.8- Análisis sensorial para determinación de vida útil.....	18
2. OBJETIVOS.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
3. ESTRATEGIA DE TRABAJO.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1- Muestreo y análisis de bizcochuelos almacenados en aire.....	25
4.1.1- Muestreo y envasado de los bizcochuelos.....	25
4.1.2- Análisis de los bizcochuelos.....	26
4.2- Identificación de los hongos causantes del biodeterioro.....	27
4.2.1- Extracción de ADN.....	27
4.2.2- Amplificación de región ITS1-ITS2.....	27
4.2.3- Amplificación de la región de beta tubulina.....	28

4.2.4- Secuenciación y análisis de secuencias.....	28
4.3- Capacidad de crecimiento en atmósfera modificada de los hongos causantes del biodeterioro.....	29
4.4- Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en medio de cultivo.....	29
4.4.1- Efecto del agregado de conservante a diferentes pHs.....	29
4.4.2- Efecto del agregado de conservante a pH 7 y envasado en ATM.....	30
4.4.3- Efecto de la actividad de agua.....	30
4.5- Estudio de diferentes variables en el crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en bizcochuelo.....	31
4.5.1- Preparación de los bizcochuelos.....	32
4.5.2- Tratamiento y envasado.....	32
4.5.3- Análisis de los bizcochuelos.....	32
4.5.4- Análisis de los datos.....	33
4.6- Crecimiento de <i>P. crustosum</i> en bizcochuelos envasados en ATM y en AIRE.....	33
4.7- PCR en tiempo real para la cuantificación de crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en bizcochuelo.....	33
4.7.1- Diseño de primers específicos.....	34
4.7.2- Condiciones de amplificación en PCR en tiempo real	34
4.7.3- Curva estándar.....	35
4.7.4- Estudio de especificidad de los primers diseñados para <i>P. crustosum</i>	35
4.7.5- Análisis del efecto matriz	36
4.8- Estudio de producción de Penitrem A.....	36
4.8.1- Estudio en medio de cultivo.....	36
4.8.2- Estudio en bizcochuelos.....	37
4.9- Análisis sensorial para determinación de vida útil.....	37
4.9.1- Muestras.....	37
4.9.2- Panel de consumidores.....	39
4.9.3- Procedimiento experimental.....	39
4.9.4- Análisis de datos.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1-Análisis de bizcochuelos almacenadas en AIRE.....	41
5.2-Identificación de los hongos causantes de biodeterioro.	41
5.3-Capacidad de crecimiento en atmósfera modificada de los hongos causantes de biodeterioro.....	43

5.4-Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en medio de cultivo.....	45
5.4.1- Efecto del agregado de conservante a diferentes pHs.....	45
5.4.2- Efecto del agregado de conservante a pH 7 y envasado en ATM.....	46
5.4.3- Efecto de la actividad de agua.....	46
5.5- Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en bizcochuelos.....	48
5.5.1- Crecimiento de <i>P. crustosum</i> en bizcochuelos en ATM a 25°C y en AIRE a 4°C.....	49
5.6- Cuantificación de ADN de <i>P. crustosum</i> en bizcochuelos por PCR en tiempo real.....	50
5.6.1- Diseño de primers específicos.....	50
5.6.2- Diseño de pcr en tiempo real.....	52
5.6.3- Curva estándar.....	55
5.6.4- Estudio de la especificidad de los primers diseñados.....	57
5.6.5- Análisis del efecto matriz.....	58
5.7- Estudio de producción de Penitrem A.....	59
5.8- Análisis sensorial para determinación de vida útil.....	60
5.8.1- Ensayo 1: Envasado en ATM N2:CO2 50:50, almacenamiento a 25°C.....	60
5.8.2- Ensayo 2: Envasado en aire, almacenamiento a 4°C.....	65
6. DISCUSIÓN.....	69
6.1- Biodeterioro de bizcochuelos almacenados en aire.....	69
6.2- Capacidad de crecimiento en atmósfera modificada de los hongos causantes de biodeterioro.	72
6.3- Efecto de diferentes variables en el crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en medio de cultivo.....	74
6.4- Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en bizcochuelos.....	75
6.5- PCR en tiempo real para la cuantificación de crecimiento de <i>Penicillium crustosum</i> en bizcochuelos.....	77
6.6- Determinación de vida útil.....	78
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS.....	90
Anexo 1- Protocolo 1 de extracción de ADN.....	90
Anexo 2- Protocolo 2 de extracción de ADN.....	91
Anexo3- Boleta de evaluación sensorial.....	93

Anexo 4- Marcadores de peso molecular utilizados.....	94
Anexo 5- Buffers y soluciones.....	95
Buffer de Lisis.....	95
Buffer CTAB.....	95
Solución de precipitación con CTAB.....	95
Anexo 6- Medios de cultivo.....	96
Medio Czapek yeast extract agar (CYA).....	96
Concentrado Czapek.....	96
Solución de metales traza.....	96
Yeast Nitrogen Base Glucose Agar (YNBGA).....	96
Yeast Extract Sucrose (YES).....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.2.1.- Especies de <i>Penicillium</i> subgénero <i>Penicillium</i>	5
Tabla 1.8.1- Modelos paramétricos log normal y Weibull.....	22
Tabla 4.5.1.- Variables del diseño factorial	31
Tabla 4.8.1- Tiempo de almacenamiento (días) para las diferentes muestras envasadas en ATM y en aire.....	38
Tabla 5.3.1- Concentración de oxígeno (O ₂) medido en el envase de placas sin inocular.....	43
Tabla 5.4.1- Diámetros de las colonias de <i>P. crustosum</i> MG bajo crecimiento de diferentes concentraciones de sorbato de potasio a pH 7, envasadas en ATM N ₂ :CO ₂ 50:50.....	46
Tabla 5.4.2- Diámetros de las colonias de <i>P. crustosum</i> MG a diferentes actividades de agua, envasadas en aire y en ATM N ₂ :CO ₂ 50:50.....	46
Tabla 5.6.1a- Secuencias de los Primers 1PCrus.....	50
Tabla 5.6.1b- Características de los primers 1PCrus.....	51
Tabla 5.6.2a- Secuencias de los Primers 2PCrus.....	51
Tabla 5.6.2b- Características de los primers 2PCrus.....	51
Tabla 5.6.3- Valores de Ct obtenidos para las muestras amplificadas por PCR en tiempo real.....	53
Tabla 5.6.4- Valores de Ct obtenidos a partir de la curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para un molde de ADN de <i>P. crustosum</i> NRRL 968 amplificado con los primers 1PCrus y 2PCrus.....	54
Tabla 5.6.5- Valores de Ct obtenidos para las muestras amplificadas de ADN de <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. commune</i> y <i>P. chrysogenum</i>	57
Tabla 5.6.6- Valores de Ct obtenidos para diluciones al décimo de ADN de <i>P. crustosum</i> en agua y en matriz.....	58
Tabla 5.8.1.1- Recuentos de mesófilos y hongos y levaduras de los bizcochuelos evaluados en el ensayo sensorial en ATM.....	60
Tabla 5.8.1.2- Media de la aceptabilidad de los consumidores para las muestras evaluadas en ATM.....	61

Tabla 5.8.1.3- Frecuencia con la que los consumidores seleccionaron los atributos para describir las diferentes muestras en ATM.....	63
Tabla 5.8.2.1- Recuentos de mesófilos y hongos y levaduras de los bizcochuelos evaluados en el ensayo sensorial en AIRE.....	65
Tabla 5.8.2.2- Media de la aceptabilidad de los consumidores para las muestras evaluadas en AIRE.....	66
Tabla 5.8.2.3- Frecuencia con la que los consumidores seleccionaron los atributos de la pregunta CATA para describir las diferentes muestras en AIRE.....	67
Tabla 5.8.2.4- Porcentaje de rechazo a la compra para las muestras con diferente tiempo de almacenamiento en AIRE.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2.1. Valores mínimos de a_w para el crecimiento de microorganismos causantes de biodeterioro en productos panificados.....	3
Figura 1.2.2.- Diferentes morfologías del aparato conidióforo de <i>Penicillium</i>	4
Figura 1.7.1- Curva obtenida de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	15
Figura 1.7.2.- Curva estándar obtenida de un ensayo de PCR en tiempo real utilizando diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de <i>P. expansum</i>	16
Figura 1.7.3- Curva de melting.....	17
Figura 1.8.1- Escala hedónica estructurada de 9 puntos.....	19
Figura 1.8.2 - Pregunta CATA para bizcochuelo.....	20
Figura 5.2.1- Porcentaje de las distintas especies fúngicas identificadas como causantes del biodeterioro en los bizcochuelos analizados.....	41
Figura 5.2.2- Árbol filogenético para el gen de la beta tubulina de <i>Penicillium</i>	42
Figura 5.3.2- Crecimiento en atmósfera modificada de los hongos aislados.....	44
Figura 5.4.1- Crecimiento de 5 cepas de <i>P. crustosum</i> aisladas de los bizcochuelos, en presencia de 1000ppm de sorbato de potasio a pH 5 y pH 7.....	45
Figura 5.4.2- Crecimiento de <i>P. crustosum</i> en diferentes condiciones expresado como porcentaje respecto al control.....	47
Figura 5.5.1- Gráfico de Pareto.....	48
Figura 5.5.2- Concentración de ADN de <i>P. crustosum</i> en función del tiempo de almacenamiento a dos condiciones de envasado.....	49
Figura 5.5.3- Concentración de ADN de <i>Penicillium crustosum</i> NRRL 968 en función del tiempo de envasado de los bizcochuelos inoculados.....	50
Figura 5.6.1- Gel de agarosa al 1.5% con los productos obtenidos de la amplificación de <i>P. crustosum</i> con los primers 1PCrus y 2PCrus.....	52
Figura 5.6.2.-. Ciclo de amplificación para PCR en tiempo real.....	52
Figura 5.6.3- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para un molde de ADN de <i>P. crustosum</i> NRRL 968, amplificado con los primers 1PCrus y 2PCrus.....	53

Figura 5.6.4- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para un molde de ADN de <i>P. crustosum</i> NRRL 968, amplificado con diferentes concentraciones de los primers 1PCrus y 2PCrus.....	54
Figura 5.6.5- Curva de fluorescencia adquirida en función de ciclos de amplificación de ADN de <i>P. crustosum</i> NRRL 968, utilizando el primer 2PCrus.....	55
Figura 5.6.6- Curva estándar de concentración de ADN de <i>P. crustosum</i> NRRL 968.....	56
Figura 5.6.7- Curva de melting para el producto de amplificación de ADN de <i>P. crustosum</i> NRRL 968.....	56
Figura 5.6.8- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diferentes especies de <i>Penicillium</i>	57
Figura 5.6.9- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diluciones al décimo de ADN de <i>Penicillium crustosum</i> en agua y en matriz.....	58
Figura 5.7.1-Resultados de la extracción de los metabolitos de <i>P. crustosum</i> MG y <i>P. crustosum</i> NRRL 968.....	59
Figura 5.8.1.1- Probabilidad de rechazo a la compra del producto en función del tiempo de almacenamiento en ATM, para el modelo log normal.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATM	Atmósfera modificada
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCF	Cromatografía en capa fina
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Ciclo Umbral
CYA	Czapek extracto de levadura agar
DRBCA	Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol Agar
EtOH	Etanol
EVOH	Etil vinil alcohol copolímero
ITS	Internal Transcribed Spacer
LLDPE	Lineal low density polyethylene (polietileno lineal de baja densidad)
N ₂	Nitrógeno
NMP	Número más probable
O ₂	Oxígeno
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDB	Caldo Papa Dextrosa
RBN	Reglamento Bromatológico Nacional
T _m	Temperatura de desnaturalización o melting
TSB	Caldo soya tripticasa
UFC	Unidades formadoras de colonias
YES	Medio líquido Sacarosa-Extracto de levadura
YNB	Medio líquido a base de levadura y nitrógeno
YNBGA	Medio a base de levadura y nitrógeno con glucosa y agar

1.INTRODUCCIÓN

1.1-Bizcohuero, un producto panificado.

Los productos de panadería elaborados a base de cereales que sufren un proceso de calor seco por convección, generalmente por horneado, se convierten en productos panificados (Chaven, 2014). Dentro de este grupo de productos se encuentran los bizcochuelos.

El bizcohuero es una torta esponjosa que se caracteriza por tener un desarrollo de los alvéolos producido por el aire incorporado durante el batido y su expansión en la cocción (Lezcano, 2011). El Reglamento Bromatológico Nacional (RBN, 1994) define bizcohuero dentro de los productos de confitería, como uno de los productos de Batido, definidos como “productos de la cocción de una masa elaborada con un proceso de batido, compuesta de: harina, huevos, almidones o féculas, azúcares y leudantes. Podrá contener también: miel, sal, agua potable, leche, aceite, manteca y sustancias aromatizantes. Se pueden utilizar rellenos o decorados de dulces, coberturas, cremas, jaleas, frutas confitadas, etc”.

Actualmente existen en el mercado bizcochuelos de origen industrial listos para rellenar. A diferencia de la opción de hornear los bizcochuelos en el hogar, el adquirir el bizcohuero listo para rellenar surge como una opción conveniente y práctica ya que insume menos tiempo (Lezcano, 2011). Los mercados que producen y comercializan tortas crecen cerca de un 1.5% por año. Estas industrias enfrentan diferentes desafíos como la reducción de costos de la tecnología para la producción industrial, el mejoramiento de la calidad y el incremento de la vida útil para poder mantener sus características durante la distribución y comercialización (Wilderjans, *et al.*, 2013). La vida útil de un producto se define según la IFST Guidelines (1993) como el tiempo en el cual un producto se mantiene seguro, mantiene las características sensoriales, físicas, químicas y microbiológicas deseadas y cumple con las declaraciones de la información nutricional en la etiqueta, siendo almacenado bajo las condiciones indicadas. En general la vida útil del bizcohuero es corta y se ve limitada por tres tipos de deterioro: químico, físico y microbiológico. El deterioro físico y químico, hace referencia a la variación en características físico-químicas de los productos. En este aspecto es de particular interés el cambio en la humedad y en la oxidación de los lípidos, ya que ambos pueden ser causa de rechazo por parte del consumidor (Smith, *et al.*, 2004). El deterioro microbiológico o biodeterioro, se define como el deterioro generado por la actividad o la presencia de microorganismos, más allá de los límites establecidos por las normativas vigentes para cada producto (Forsythe & Hayes, 2000). El deterioro microbiológico es el deterioro más importante ya que no sólo afecta a la calidad del producto sino también la inocuidad del mismo (Berk, 2013). A su vez, es un problema para las industrias por las pérdidas económicas que genera. Las mismas varían entre 1 y 5% de los

productos dependiendo la estación del año, el tipo de producto, el método de procesamiento y las condiciones de almacenamiento (Marín, *et al.*, 2002). Los hongos son los microorganismos responsables de la mayoría de los problemas de biodeterioro en bizcochuelos (Forsythe & Hayes, 2000). El crecimiento de los hongos desarrolla micelio visible en la superficie del producto, generando así el rechazo del consumidor hacia el mismo. A su vez, los hongos producen exoenzimas durante su crecimiento como lipasas, proteasas, carbohidrasas que pueden alterar las propiedades sensoriales del producto produciendo sabores desagradables y decoloración. Además pueden producir micotoxinas, las cuales presentan un riesgo para el consumidor (Dagnas & Membré, 2013).

1.2- Biodeterioro de productos panificados

Los microorganismos que generan biodeterioro son bacterias, hongos y levaduras. El crecimiento de los mismos en los alimentos depende de varios factores como la actividad de agua (a_w), pH, temperatura y flora competitiva (Abellana, 1997). La *Figura 1.2.1* representa un diagrama donde se ven distintos grupos de panificados con sus a_w características y los diferentes microorganismos que podrían causar deterioro (Seiler, 1998). Productos de baja humedad con a_w menores a 0.60 no presentan riesgo de deterioro microbiológico, productos de humedad intermedia con a_w entre 0.6 y 0.85 son deteriorados principalmente por levaduras osmofílicas y hongos en general, mientras que en los productos de alta humedad con a_w entre 0.94 y 0.99 la mayoría de las bacterias, levaduras y hongos son capaces de crecer (Smith, *et al.*, 2004).

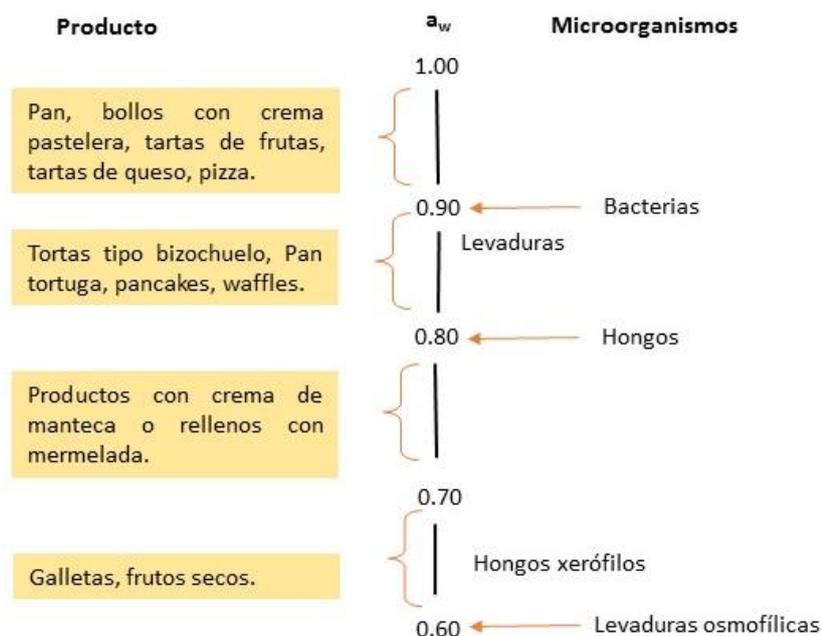


Figura 1.2.1- Valores mínimos de a_w para el crecimiento de microorganismos causantes de biodeterioro en productos panificados (Seiler, 1998, Smith, *et al.*, 2004).

Los bizcochuelos son productos de humedad intermedia presentando actividades de agua entre 0.75 y 0.90 (Seiler, 1998, Guynot, *et al.*, 2004), por lo tanto los mismos pueden ser deteriorados tanto por hongos como por levaduras. Los hongos más frecuentemente aislados como causantes de deterioro en bizcochuelos fueron *Wallemia sebi*, *Eurotium* spp. los cuales pertenecen al grupo de los hongos xerófilos, *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. (Smith, *et al.*, 2004). También se han aislado en menor frecuencia especies de los géneros *Cladosporium*, *Mucor* y *Rhizopus* (Guynot, *et al.*, 2004). En particular, en bizcochuelos han sido descritos como causantes de deterioro varias especies de *Penicillium* entre las que se encuentran *P. crustosum*, *P. glabrum*, *P. commune*, *P. chrysogenum* (Pitt & Hocking, 2009).

El género *Penicillium* es muy diverso tanto por el número de especies como por los hábitats donde se encuentra (Pitt & Hocking, 2009). Está integrado por aproximadamente 250 especies, muchas de las cuales son anamórficas porque no se les conoce ciclo sexual. El nombre del género (*Penicillium*) se asocia a la forma que presenta el aparato conidióforo (estructura especializada en la reproducción asexual, que genera conidias), con forma de pincel (*penicillius*). Según la micromorfología del conidióforo, las cepas de este género pueden clasificarse en monoverticiladas, biverticiladas y terverticiladas (Figura 1.2.2). De acuerdo a ello se definieron 4 subgéneros *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* y *Pencillium* (Pitt & Hocking, 2009).

Actualmente, basado en análisis filogenéticos, las especies pertenecientes al subgénero *Biverticillium* han sido reclasificadas dentro del género *Talaromyces* (Visagie, *et al.*, 2014), por lo cual sólo se reconocen 3 subgéneros dentro del género denominado *Penicillium sensu stricto* (Houbraken & Samson, 2011).

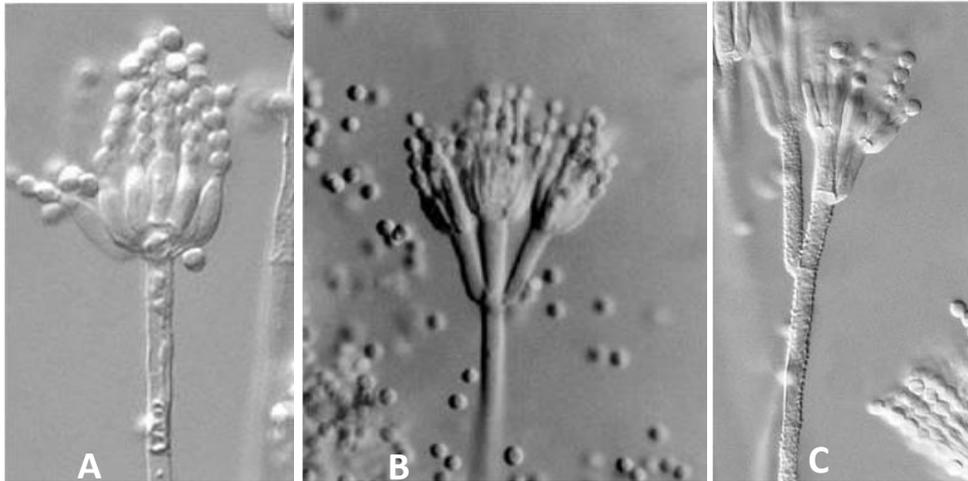


Figura 1.2.2.- Diferentes morfologías del aparato conidióforo de *Penicillium*. A- *P. glabrum*, conidióforo monoverticilado. B- *P. citrinum*, conidióforo biverticilado. C- *P. crustosum*, conidióforo terverticilado. (Figuras de Pitt J & Hocking A b, 2009)

El subgénero *Penicillium*, que a su vez se divide en 6 secciones (*Tabla 1.2.1*), está conformado por especies cuyos conidióforos son terverticilados. Numerosas especies pertenecientes a este subgénero están relacionadas con el biodeterioro de alimentos y en algunos casos han sido descritas como importantes productoras de micotoxinas (Samson, *et al.*, 2004, Geisen, 2015).

Tabla 1.2.1.- Especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium*, clasificadas en base a su morfología, su patrón de crecimiento, ecología, extrolitos y secuencias parciales de beta tubulina (Samson, *et al.*, 2004).

Sección <i>Coronata</i>	<i>P. bialowiezense</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. olsonii</i>	Sección <i>Digitata</i>	<i>P. digitatum</i>
Sección <i>Roqueforti</i>	<i>P. carneum</i> <i>P. paneum</i> <i>P. roqueforti</i>	Sección <i>Viridicata</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. cycopium</i> <i>P. freii</i> <i>P. melanoconidium</i> <i>P. neoechinulatum</i> <i>P. polonicum</i> <i>P. tricolor</i> <i>P. viridicatum</i> <i>P. albocoremium</i> <i>P. allii</i> <i>P. hirsutum</i> <i>P. hordei</i> <i>P. radicola</i> <i>P. tulipae</i> <i>P. venetum</i> <i>P. nordicum</i> <i>P. thymicola</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. atramentosum</i> <i>P. camemberti</i> <i>P. caseifulvum</i> <i>P. commune</i> <i>P. crustosum</i> <i>P. palitans</i> <i>P. cavernicola</i> <i>P. discolor</i> <i>P. echinulatum</i> <i>P. solitum</i>
Sección <i>Chrysogena</i>	<i>P. chrysogenum</i> <i>P. dipodomyis</i> <i>P. flavigenum</i> <i>P. nalgiovense</i> <i>P. confertum</i> <i>P. mononematosum</i> <i>P. persicinum</i> <i>P. aethiopicum</i>		
Sección <i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> <i>P. marinum</i> <i>P. sclerotigenum</i> <i>P. clavigerum</i> <i>P. concentricum</i> <i>P. coprobium</i> <i>P. coprophilum</i> <i>P. formosanum</i> <i>P. glandicola</i> <i>P. vulpinum</i> <i>P. dipodomyicola</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. italicum</i> <i>P. ulaiense</i> <i>P. gladioli</i>		

1.3- Hongos causantes de biodeterioro, productores de micotoxinas

Varias de las especies descritas como causantes de biodeterioro en productos panificados son productoras de micotoxinas (Legan, 1993). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos, que presentan toxicidad para vertebrados (Kokkonen, *et al.*, 2005). Los metabolitos fúngicos que son activos contra bacterias, protozoarios y pequeños animales como insectos no se consideran micotoxinas (Frisvad, *et al.*, 2006). También se excluyen las toxinas de Basidiomycetes porque el contacto con las mismas es por la ingesta de los cuerpos de fructificación de los Basidios, lo cual se considera diferente a la ingesta de toxinas generada por los hongos que no presentan cuerpo de fructificación.

La exposición a estas toxinas puede darse de diferentes formas. Por lo general es mediante la ingesta de alimentos contaminados por hongos que producen estos compuestos, aunque también puede darse por la inhalación o el contacto dérmico con los mismos. Los efectos producidos por la intoxicación pueden ser efectos agudos, producidos por altos niveles de micotoxina, que pueden ir desde malestares hasta trastornos graves. Los efectos también pueden deberse a la intoxicación por la exposición continua a niveles bajos de toxina que genera enfermedades crónicas las cuales se manifiestan por ejemplo en la formación de tumores, retraso en el crecimiento, alteraciones en el sistema inmune generando menos resistencia a enfermedades (CAST, 2003).

Los hongos micotoxigénicos difieren en su morfología, bioquímica y nicho ecológico, por lo cual no es posible describir una combinación de condiciones favorables para el crecimiento y producción de las micotoxinas (CAST, 2003). En general las micotoxinas se producen en condiciones más restringidas que las necesarias para el crecimiento del hongo (Kokkonen, *et al.*, 2005). La mayoría de las especies toxigénicas que se conocen pertenecen a tres géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

Varias especies de *Penicillium* terverticiladas son reconocidas por su capacidad de producir micotoxinas. De las cuatro especies de *Penicillium* mencionadas anteriormente como contaminantes de bizcochuelos, tres son *Penicillium* terverticilados capaces de producir micotoxinas. *P. chrysogenum* produce toxina PR y roquefortin C, *P. commune* produce ácido cyclopiazónico, y *P. crustosum* produce penitrem A, roquefortin C, ácido terréstrico así como otros metabolitos secundarios (Frisvad & Samson, 2004, Sonjak, *et al.*, 2005, Pitt & Hocking, 2009).

Todos los aislamientos de *P. crustosum* han sido descritos como productores de la neurotoxina Penitrem A en altas cantidades (Sonjak, *et al.*, 2005, Pitt & Hocking, 2009). Esta toxina es principalmente intracelular (Filtenborg, *et al.*, 1983, Weidenbörner, 2001) y es un compuesto tremorgénico altamente tóxico (Frisvad, *et al.*, 2006) que causa temblores, ataxia, debilidad en las extremidades y convulsiones. La LD50 en ratones administrada de forma intraperitoneal es de 1.05mg/Kg (El-Banna & Leistner, 1988). Este compuesto ha estado implicado en intoxicaciones producidas en animales (Naudé TW, *et al.*, 2002) y también se han detectado intoxicaciones en humanos (Lewis PR, *et al.*, 2005). La producción de esta toxina se da en condiciones de altas actividades de agua, alrededor de 0.92 (ICMSF, 1996), con la actividad de agua óptima para su producción en 0.99. Pitt & Hocking (2009) suponen que debido al requerimiento de una elevada actividad de agua para la producción de Penitrem A es que hay

pocos casos de intoxicación reportados por este compuesto que además de ser altamente tóxico es producido por un hongo aislado frecuentemente como contaminante de alimentos.

1.4-Factores que afectan el crecimiento de los hongos causantes de biodeterioro de productos panificados

La contaminación microbiológica se produce luego del proceso de horneado, ya que a las temperaturas a las que este proceso se realiza, se elimina toda contaminación pre-existente. La contaminación se debe a esporas presentes en la atmósfera o en las superficies en donde se realizan los procesos de enfriado, finalización y envasado de los productos (Marín, *et al.*, 2002). Si bien los programas de limpieza y desinfección en áreas de producción son fundamentales para reducir esta contaminación, no son suficientes para impedir el biodeterioro, por lo cual hay que hacer uso de otras estrategias que afectan directamente al producto (Seiler, 1998). Existen dos grupos de factores que influyen el crecimiento de microorganismos en los productos alimenticios: factores intrínsecos del producto y extrínsecos (Seiler 1998). Dentro del primer grupo están factores como la actividad de agua, el grado de acidez, el contenido de nutrientes y la presencia de inhibidores naturales. Dentro del segundo grupo se encuentran la temperatura de almacenamiento, la adición de conservantes, la humedad relativa y la composición gaseosa de la atmósfera que rodea al producto (Seiler, 1998, Dagnas & Membré, 2013).

1.4.1- Actividad de agua

El agua disponible en una matriz se mide como la actividad de agua. Este parámetro adimensional se define como la relación entre la presión de vapor de agua en un sistema y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Se relaciona de una manera no lineal con el contenido de humedad del producto a una temperatura dada, por medio de las isoterms de adsorción y desorción (Fernández, 2011). La medida de actividad de agua se asocia con la proporción de agua disponible para reacciones químicas y biológicas por lo tanto afecta el crecimiento, la esporulación, la producción de toxina y la supervivencia de los microorganismos en el producto durante el almacenamiento. La disminución de la actividad de agua es una forma de conservación de los alimentos, ya que al disminuir la actividad de agua aumenta la presión osmótica y las células sufren plasmólisis (Fernández, 2011). Esta disminución puede obtenerse

mediante el agregado de diferentes solutos como glucosa, sorbitol, fructosa, sacarosa, glicerol. El problema de utilizar esta estrategia en alimentos es que muchas veces las cantidades de solutos necesarias para impedir el crecimiento de microorganismos alteran negativamente las propiedades sensoriales del mismo. Además, dado que los consumidores exigen productos naturales, la tendencia es utilizar otras estrategias de conservación que no impliquen el agregado de sustancias químicas (Smith, *et al.*, 2004).

1.4.2- Concentración de H⁺ (pH)

El pH de la mayoría de los alimentos se encuentra en un rango de entre 3 y 8, el cual permite el crecimiento de hongos, bacterias y levaduras (Wheeler, *et al.*, 1991). Este factor tiene efectos indirectos en el crecimiento de los hongos generadores de biodeterioro como cuando se adicionan ácidos orgánicos débiles como conservantes. El pH modula el efecto de la actividad antimicrobiana de estos compuestos, ya que determina la proporción de la forma activa no disociada (Dagnas & Membré, 2013), cuya concentración aumenta a medida que disminuye el pH (Guynot, *et al.*, 2005). Para disminuir el pH en los productos panificados se adicionan acidulantes como ácidos orgánicos, ejemplos son el ácido cítrico, láctico, acético, o también se pueden utilizar inóculos de bacterias ácido lácticas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el uso de estas estrategias puede alterar las propiedades sensoriales del producto (Smith, *et al.*, 2004).

1.4.3- Conservantes

Para la conservación de los productos panificados es común el uso de ácidos orgánicos débiles como los ácidos propiónico, benzoico y sórbico (Marín, *et al.*, 2002). Estos ácidos orgánicos actúan como conservantes. El término conservante se define según el Código de Regulación Federal del Gobierno de los Estados Unidos (CFR) como un agente antimicrobiano utilizado para preservar los alimentos, previniendo el crecimiento de microorganismos y su deterioro subsecuente (Saranraj & Geetha, 2012). Estos ácidos orgánicos suelen utilizarse en forma de sales, ya que muchas veces presentan una mejor solubilidad. Estos compuestos son pH dependientes, debido a que sólo son efectivos a pH menores o iguales que su pK_a más una unidad de pH, ya que la forma no disociada del ácido es la que presenta actividad antimicrobiana (Pitt & Hocking, 2009). El ácido en su forma no disociada es capaz de penetrar la membrana por difusión (Stratford, *et al.*, 2009). Una vez dentro de la célula se disocia, debido a que el pH del citosol es cercano a la neutralidad, liberando hidrogeniones al medio intracelular, los cuales se

acumulan dentro de la célula ya que por ser moléculas cargadas no pueden difundir a través de la membrana. De esta forma se acidifica el medio intracelular, generando desnaturalización e inactivación de enzimas, inhibiendo el crecimiento celular (Guynot, *et al.*, 2005). Stratford, *et al.* (2009) mencionan que el ácido sórbico además de inhibir el crecimiento por el mecanismo anteriormente descrito, tiene mecanismos de acción adicionales de inhibición que involucran a la membrana confiriéndole una mayor toxicidad que al ácido acético.

El uso de conservantes está regulado por ley, permitiendo según el país diferentes concentraciones a utilizar en los diferentes productos alimenticios (Pitt & Hocking, 2009). En el caso de Uruguay, el Reglamento Bromatológico Nacional especifica los aditivos que se pueden utilizar como conservantes, la concentración máxima permitida y el tipo de producto en el que se pueden utilizar. La reglamentación nacional permite para productos panificados el uso de propionato de sodio a 2000 partes por millón (ppm) y de sorbato de potasio a 1000 ppm. El sorbato de potasio está descrito como el conservante más utilizado en productos panificados, ya que tiene mayor efectividad en las condiciones de pH y actividad de agua encontrados en los productos panificados (Guynot, *et al.*, 2004). Sin embargo estudios como los de Marín, *et al.* (2002) concluyen que para productos panificados con pH cercanos a 7, como los bizcochuelos, otras alternativas deben de ser consideradas por la baja eficacia de estos conservantes. Otro problema que presenta el uso de conservantes, es que los consumidores están optando por productos “naturales”, es decir, sin el agregado de aditivos químicos. Por ello se han realizado esfuerzos por disminuir la concentración de los mismos o eliminarlos completamente haciendo uso de otras estrategias de conservación (Guynot, *et al.*, 2004).

1.4.4- Temperatura de almacenamiento

La temperatura es otro factor importante que determina el crecimiento fúngico (Dagnas & Membré, 2013). En general, la mayoría de los hongos que generan biodeterioro en los productos panificados son hongos mesófilos, capaces de crecer a temperaturas entre 10 y 40°C, con su rango óptimo de crecimiento entre 25 y 35°C (Seiler 1998). En ambientes templados, estos hongos presentan su óptimo de crecimiento a temperatura ambiente. Como la mayoría de los hongos que generan biodeterioro son mesófilos se han desarrollado estrategias para la conservación y comercialización de productos panificados a temperaturas de refrigeración (+4°C) y congelación (-20°C) ya que al disminuir la temperatura, disminuye el crecimiento de los hongos.

El mercado de productos panificados congelados ha venido en aumento en los últimos años (Meziani, *et al.*, 2012), desarrollándose tecnologías para comercializar los mismos. De esta manera se pueden encontrar los diversos tipos de productos panificados congelados como masas fermentadas congeladas, masas sin fermentar congeladas, productos congelados listos para consumir o productos congelados pre-horneados (Lebail & Goff, 2009). El problema que a veces presentan estos productos, es que durante el proceso de congelamiento se generan cambios físicos y químicos, que disminuyen los nutrientes o generan cambios en las propiedades sensoriales, por ejemplo en la textura y en la apariencia (Berry, *et al.*, 2008, Meziani, *et al.*, 2012).

1.4.5- Condiciones de envasado

El envasado permite modificar la composición de la atmósfera que rodea el alimento ya sea por la eliminación del oxígeno disponible o por la inyección de gases que inhiban el crecimiento de los microorganismos presentes. En el caso de los bizcochuelos no es posible utilizar el vacío, ya que al generar vacío se retira el aire del empaque, retirando también el aire remanente dentro del producto, generando así la pérdida de volumen y por ende de calidad del mismo. Por lo tanto para este tipo de productos se recomienda el envasado en atmósfera modificada (Çelik, *et al.*, 2007). Esta estrategia se basa en modificar el aire del empaque, manteniendo el producto bajo una atmósfera gaseosa reducida en oxígeno la cual se reemplaza por una cantidad equivalente de otros gases (Taniwaki, *et al.*, 2009).

Los gases más utilizados en las mezclas comerciales para generar atmósferas modificadas son nitrógeno y dióxido de carbono. Aunque también se pueden utilizar gases como el helio y argón (Parry, 1993). El nitrógeno es un gas inerte, insípido que no tiene actividad antimicrobiana. Su presencia en la mezcla de gases es importante ya que por su baja solubilidad en agua evita que los envases colapsen cuando se trata de productos que pueden absorber CO₂. El CO₂ es bacteriostático y fungistático, sus efectos varían con la concentración, la temperatura de almacenamiento, el microorganismo a inhibir y la a_w del medio (Guynot, *et al.*, 2003). La recomendación general para las mezclas de gases utilizadas en el envasado en ATM es 60% CO₂/40% N₂, aunque la composición de la mezcla se adapta según el tipo de producto (Suhr & Nielsen, 2005). Estudios mostraron que productos con mayor a_w necesitan mayor concentración de CO₂ (Guynot, *et al.*, 2004). Las compañías que comercializan cilindros de gases sugieren diferentes mezclas gaseosas para generar atmósferas modificadas según los productos. Air Liquide sugiere la mezcla *Aligal 15*, compuesta por N₂:CO₂ 50:50 para productos panificados como budines (Air-Liquide, 2011). Mezclas de gases con altas concentraciones de CO₂ (mayores

a 70%) si bien son efectivas en evitar el deterioro no son recomendables para bizcochuelos. El CO₂ es hidrosoluble y liposoluble, por lo cual puede generar el colapso del envase. Además este compuesto solubilizado genera ácido carbónico, provocando un descenso en el pH del producto y cambios sensoriales como sabores ácidos (Guynot, *et al.*, 2003).

Un factor fundamental en el envasado en ATM es la permeabilidad del envase de empaque. El éxito o el fracaso de esta estrategia en impedir el biodeterioro de alimentos dependen de la impermeabilidad del envase a CO₂ y O₂ para mantener la correcta mezcla gaseosa dentro del envase. A su vez el material del envase debe de tener una baja tasa de transmisión de vapor de agua para prevenir la variación en la humedad del producto. El material de las bolsas que se utilizan para el envase está compuesto por polímeros, siendo los más utilizados la poliamida (nylon), polipropileno (PP), cloruro de polivinilideno (PVDC), etil vinil alcohol copolímero (EVOH) y polietileno de baja y alta densidad (LDPE/HDPE) (Smith, *et al.*, 2004).

Bolsas compuestas de LDPE/HDPE se utilizan para productos panificados de corta vida útil (2 o 3 días) como por ejemplo para el pan. Para productos que se deseen almacenar por un tiempo mayor se deben utilizar bolsas compuestas por la co-extrusión de varios polímeros. Ejemplos de las mismas incluyen nylon/PE, nylon/PVDC/PE o nylon/EVOH/PE. Estas composiciones tienen todas las características deseadas para lograr una bolsa apropiada para el envasado en atmósfera modificada. La capa externa de nylon le brinda resistencia a la bolsa. La impermeabilidad a los gases y a la humedad la proporciona el polímero PVDC o EVOH y el sellado por calor que lo permite el PE (Smith, *et al.*, 2004).

Entre las desventajas del uso de la ATM está la posibilidad de crecimiento de microorganismos anaerobios como *Clostridium botulinum*, productor de la toxina botulínica de riesgo letal para el consumidor (Suppakul, *et al.*, 2003). Atmósferas con bajo contenido de oxígeno, hasta aproximadamente 1.2% permiten el crecimiento de la especie *Clostridium sporogenes*, que se considera el equivalente no toxigénico de *C. botulinum* (Taniwaki, *et al.*, 2009, Carter & Peck, 2015).

1.5- Combinación de diferentes estrategias para inhibir el crecimiento fúngico

Debido a que ninguna de las estrategias es 100% efectiva en impedir el crecimiento microbiano en alimentos, se utilizan combinaciones de estrategias con efecto sinérgico o complementario (Guynot, *et al.*, 2003). El uso combinado de diferentes estrategias de conservación se conoce como “efecto barrera” conocido en inglés como “hurdle technology” (Berk, 2013) y se ha utilizado para mejorar la estabilidad microbiológica y química, y la calidad sensorial de los alimentos, así como sus propiedades nutricionales y su costo (Rahman, 2015). Conocer cómo los diferentes factores involucrados afectan la fisiología y el comportamiento de los diferentes microorganismos es de gran importancia para hacer un uso adecuado del “efecto barrera”(Rahman, 2015).

Autores como Guynot, *et al.* (2003) (2004) han estudiado los efectos de la acción sinérgica de a_w , pH, adición de conservantes y atmósfera de envasado en el crecimiento de diferentes especies de *Eurotium* en bizcochuelos. Los resultados del estudio mostraron que el crecimiento fúngico podía inhibirse sin el uso de conservantes si se utilizaba una mezcla de gases adecuada (contenido de CO₂ no menor a 70%), la cual dependía de la a_w del producto. El crecimiento fúngico también logró inhibirse con mezclas de gases con menor contenido de CO₂ en combinación con el agregado de conservante. A pH 6 la inhibición se logró mediante el agregado de 1000 ppm de sorbato de potasio utilizando mezclas de gases de entre 50% y 70% CO₂ balanceadas con N₂, mientras que a pH 7.5 se utilizó la combinación de 2000 ppm de sorbato de potasio con atmósferas compuestas por entre 30%-70% CO₂ balanceadas con N₂. En estas condiciones los bizcochuelos lograron mantenerse sin biodeterioro por 28 días a 25°C.

1.6- Métodos de cuantificación de crecimiento fúngico

Para estudiar los efectos de las diferentes variables sobre el crecimiento fúngico se hace necesario desarrollar un método sensible, rápido y confiable para determinarlo. El crecimiento fúngico no es fácilmente cuantificable, ya que a diferencia de bacterias y levaduras, los hongos no crecen como células individuales, sino que lo hacen como hifas filamentosas, las cuales están compuestas por varias células. Las hifas pueden penetrar sustratos sólidos como alimentos, lo cual hace difícil su extracción de los mismos (Taniwaki, *et al.*, 2006).

Varios métodos han sido desarrollados para cuantificar el crecimiento fúngico. El método más frecuente es el recuento de propágulos viables, expresado como unidades formadoras de colonias (UFC). La desventaja que presenta este método es que los recuentos obtenidos son principalmente el reflejo de la cantidad de esporas más que de la biomasa total presente. El número de recuentos va a ser bajo si la colonia es joven y quedará determinado por el número de propágulos obtenidos al realizar la homogenización del hongo sobre el sustrato. Luego de la esporulación, ocurre un aumento importante en el número de las unidades formadoras de colonia obtenidas, sin que ello signifique un aumento proporcional de biomasa (Marín, *et al.*, 2003, Taniwaki, *et al.*, 2006).

La medida del diámetro de la colonia es otro método utilizado con mucha frecuencia para cuantificar crecimiento fúngico sobre superficies. Este método fue utilizado en los estudios de Guynot, *et al.* (2003) (2004) para medir crecimiento fúngico sobre bizcochuelos. La desventaja que presenta este método es que no tiene en cuenta la densidad de la colonia, lo cual es importante para conocer la biomasa.

Otros métodos desarrollados para estimar el crecimiento fúngico son: la estimación del peso seco de micelio y la cuantificación de componentes celulares específicos de los hongos como quitina y ergosterol presentes en la pared y la membrana celular respectivamente (Marín, *et al.*, 2005, Taniwaki, *et al.*, 2006, Porep, *et al.*, 2014). La cuantificación de dichos compuestos no es sencilla analíticamente y además no permite distinguir entre las diferentes especies fúngicas que pueden estar presentes en el sustrato (Arquiza & Hunter, 2014).

En este contexto surge la utilización de técnicas moleculares como la metodología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real como una técnica confiable, sensible, específica y rápida para detectar y cuantificar el ADN fúngico presente en una muestra (Arquiza & Hunter, 2014, Tannous, *et al.*, 2015). El uso de esta metodología para cuantificar la carga fúngica ha sido estudiada en el análisis de muestras de polvo de ambientes interiores (Haugland, *et al.*, 2004), raciones para animales (Suanthie, *et al.*, 2009), en contaminación fúngica de cultivos agrícolas (Gil-Serna, *et al.*, 2009, Shweta, *et al.*, 2013).

La cantidad de ADN en un cultivo fúngico es proporcional a la cantidad de biomasa micelial. Esta relación permite observar cambios en la biomasa mediante la cuantificación de ADN (Arquiza & Hunter, 2014). Además el método de PCR en tiempo real puede ser diseñado para dirigir la amplificación del ADN hacia la especie fúngica de interés, eliminando la desventaja que presentaba la medida del ergosterol que no permitía distinguir entre diferentes especies

fúngicas. A su vez, la PCR en tiempo real es fácil y rápida de realizar en comparación con los métodos anteriormente mencionados (Tannous, *et al.*, 2015).

1.7- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

La PCR es una reacción que se utiliza para amplificar una secuencia específica de ADN. Para llevar a cabo la misma se necesita un molde de ADN, dos oligonucleótidos (primers) que se unan a los extremos de la secuencia de ADN que se quiere amplificar, dNTPs (nucleótidos trifosfato), una enzima polimerasa termoestable y un buffer que contenga iones magnesio. La reacción se lleva a cabo mediante ciclos repetidos, variando la temperatura en un mismo ciclo. Al comienzo de la reacción se aumenta la temperatura, alrededor de 95°C, para separar las hebras de la hélice de ADN, posteriormente se baja la temperatura para permitir que los primers hibriden con las hebras de ADN y finalmente se aumenta la temperatura, alrededor de 72°C, la cual es la temperatura óptima para que la polimerasa extienda los primers incorporando los nucleótidos trifosfato. La temperatura de hibridación depende de cada par de primers. Teóricamente debería de estar unos grados por debajo de la temperatura de melting de los mismos (Kubista, *et al.*, 2006).

La reacción de PCR en tiempo real permite además de amplificar el ADN, cuantificar la concentración inicial del mismo. Para realizar esta reacción además de los componentes utilizados anteriormente, se necesita un compuesto fluorescente que se una al producto formado reportando su presencia mediante la emisión de fluorescencia. Se utilizan diferentes sondas o agentes intercalantes para este fin, estos reporteros emiten fluorescencia la cual se relaciona con la cantidad de producto formado (Kubista, *et al.*, 2006). Dorak (2007) define a la PCR en tiempo real como la recolección continua de señales de fluorescencia de una o más reacciones en cadena de la polimerasa en un determinado número de ciclos. La forma de cuantificación en esta metodología es mediante la conversión de las señales de fluorescencia de cada reacción en un valor numérico para cada muestra. Es entonces que como resultado de la PCR en tiempo real se obtiene un gráfico de valores de fluorescencia en función del número de ciclos para cada reacción (*Figura 1.7.1*). En los primeros ciclos de amplificación la señal de fluorescencia es débil, ya que hay poco ADN amplificado, por lo que la misma no puede distinguirse del ruido de fondo. A medida que transcurren los ciclos de amplificación, aumenta la cantidad de producto de forma exponencial lo cual permite observar un aumento en la señal de fluorescencia. Finalmente, la señal de fluorescencia deja de aumentar en la llamada fase plateau que ocurre cuando uno de los componentes esenciales para realizar la reacción se agota (Kubista, *et al.*, 2006).

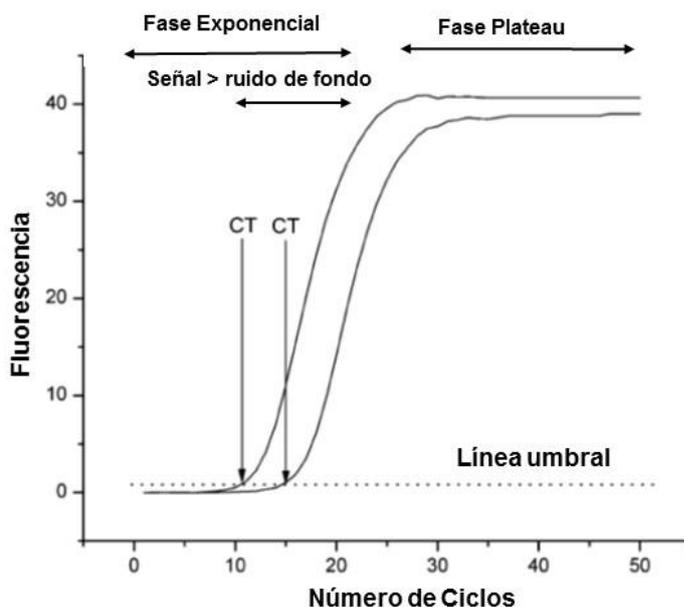


Figura 1.7.1- Curva obtenida de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La línea umbral se coloca por encima del ruido de fondo, se señala el número de ciclos necesarios para alcanzar la línea umbral, Ct. (Figura adaptada de Kubista, *et al.*, 2006).

La velocidad con la que cada reacción llega a la fase exponencial depende de la cantidad de ADN inicial. La diferencia en la cantidad de ADN se cuantifica comparando el número de ciclos de amplificación necesarios para que las muestras logren alcanzar un valor umbral de fluorescencia, más conocido en inglés como threshold. Este valor debe colocarse en la región donde el producto de PCR presenta un crecimiento exponencial (Dorak, 2007). El número de ciclos necesarios para alcanzar este valor umbral se denomina Ct. El valor Ct está inversamente correlacionado al logaritmo del número inicial de copias de ADN.

Esta metodología requiere de la realización de una curva estándar (Figura 1.7.2) en la cual se utilizan concentraciones iniciales conocidas del ADN de interés, en general se utilizan diluciones sucesivas al décimo para realizar la curva. Se grafican los valores de Ct obtenidos para dichas muestras en función del logaritmo de la concentración inicial de ADN (N_0). Los datos se ajustan a la ecuación $Ct = K \cdot \log(N_0) + Ct_1$. A partir de esta curva se puede calcular la eficiencia de la reacción (Kubista, *et al.*, 2006). En la reacción ideal con 100% de eficiencia se lograrían obtener en la fase exponencial dos moléculas de ADN a partir de una molécula. La eficiencia de la reacción se calcula utilizando el valor de la pendiente de la curva estándar mediante la ecuación $\text{Eficiencia} = [10^{(-1/k)}] - 1$, siendo k la pendiente de la curva. La eficiencia de la reacción debe estar entre 0.90-1.00, lo cual corresponde a valores en la pendiente entre 3.1 y 3.6. A su vez es

importante observar el coeficiente de correlación (R^2) ya que este parámetro muestra cómo se ajustan los datos con el modelo lineal, valores cercanos a 1 muestran un mejor ajuste (Dorak, 2007).

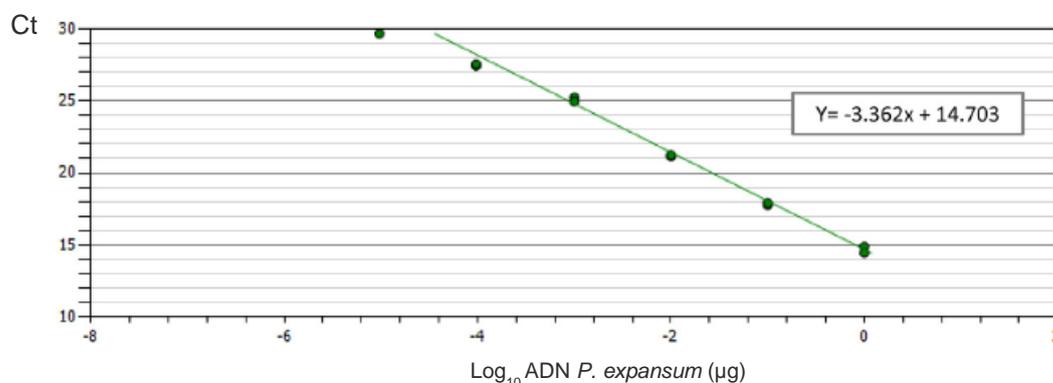


Figura 1.7.2.- Curva estándar obtenida de un ensayo de PCR en tiempo real utilizando diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *P. expansum*. La eficiencia de la reacción fue de 99.7% y su R^2 de 0.984 (Tannous, *et al.*, 2015).

Otro parámetro importante que permite determinar la curva estándar es el rango dinámico, este rango corresponde a las cantidades de ADN de concentración conocida cuyo logaritmo tiene una relación lineal con el valor de Ct calculado para las mismas (Dorak, 2007). La curva estándar permite cuantificar ADN de muestras de concentración desconocida. Obteniendo el valor de Ct de las mismas mediante PCR en tiempo real se interpola en la curva estándar dicho valor, para así obtener la cantidad de ADN de la muestra, siendo esto posible si los valores de Ct obtenidos se encuentran dentro del rango dinámico. Sólo se podrán conocer cantidades de ADN que pertenezcan a este rango, ya que sólo estos valores se van a ajustar a la ecuación de la curva.

En general el ADN utilizado en las diluciones para construir la curva estándar es ADN extraído de micelio puro. En cambio, muchas veces el ADN que se desea cuantificar es extraído de diferentes sustratos, como alimentos. En estos casos es importante considerar que las diferentes matrices de donde se extraiga el ADN pueden tener sustancias inhibitorias que reduzcan la eficiencia de la PCR. En estos casos es necesario utilizar un protocolo adecuado de extracción de ADN, y en caso de que se detecten interferencias en la reacción de amplificación pueden realizarse diluciones de forma de disminuir la concentración de las sustancias inhibitorias, eliminando o minimizando así el efecto de la matriz (Cankar, *et al.*, 2006, Branquinho, *et al.*, 2012).

Para visualizar el producto de la reacción se utilizan compuestos fluorescentes que pueden ser sondas que hibridan con una secuencia específica de ADN o marcadores no específicos como intercalantes de ADN. El ejemplo más utilizado de los primeros son las sondas Taqman, mientras

que un ejemplo de los segundos es el SYBR® Green (Gil-Serna, *et al.*, 2009). Esta última es una molécula que se une sólo al ADN doble hebra emitiendo fluorescencia. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN doble hebra. La desventaja que presenta este método de detección de ADN es que no es específico de una secuencia como sucede con la detección por sondas como Taqman. Por esta razón el diseño de primers específicos para la secuencia de ADN blanco que se quiere amplificar es fundamental (Dorak, 2007). A su vez, es importante conocer las características de los primers a utilizar, ya que la formación de dímeros de primers generará fluorescencia por unión del SYBR® Green a dichas estructuras doble hebra. Para conocer si sólo hubo amplificación de un producto sin interferencia de dímeros de primers se realizan las curvas de melting al finalizar la reacción de PCR. La curva de melting se realiza aumentando la temperatura del producto de PCR obtenido de forma de separar las hebras de ADN para que se libere el SYBR® Green, de esta forma a medida que se abren las hebras va disminuyendo la fluorescencia emitida. La curva de melting, es el opuesto de la derivada de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura (Figura 1.7.3). El pico de la curva indica la temperatura de melting del producto de amplificación (Dorak, 2007).

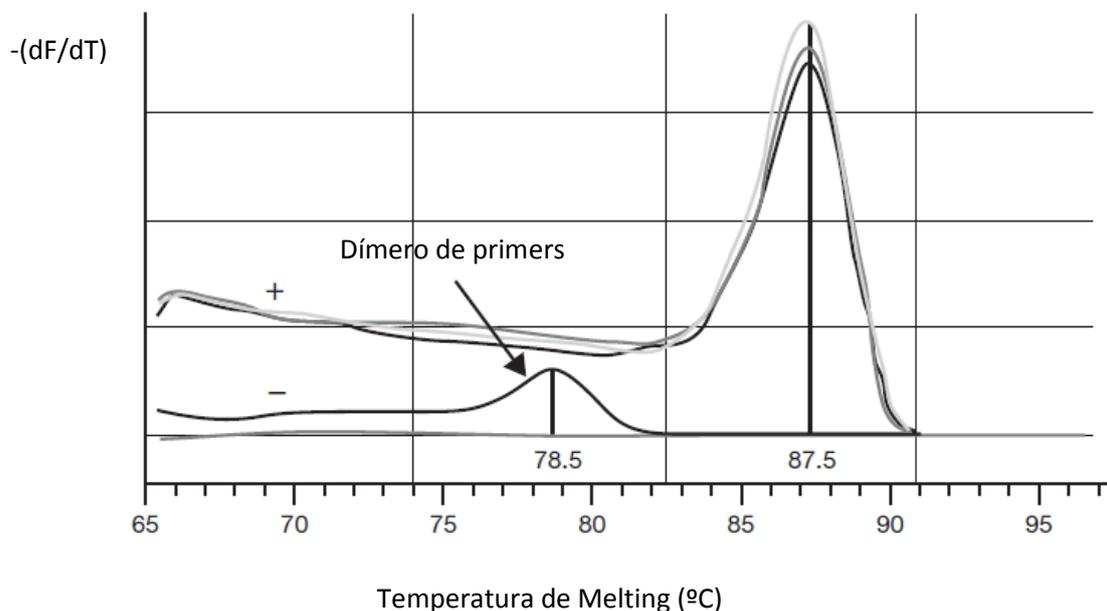


Figura 1.7.3- Curva de melting. Se distingue entre el producto específico de PCR y el producto no específico (dímero de primers) (Dorak, 2007).

1.8- Análisis sensorial para determinación de vida útil

El uso de estrategias para prolongar la vida útil de los alimentos, tales como las descritas anteriormente en el ítem 1.4, permite obtener productos con características microbiológicas adecuadas por un período de tiempo relativamente largo. En estos casos pueden ocurrir cambios sensoriales perceptibles antes de percibirse el crecimiento fúngico. Estos cambios son percibidos negativamente y generan rechazo por parte de los consumidores por lo tanto serán los determinantes de la vida útil del producto. En estas situaciones los estudios de evaluación sensorial se utilizan para determinar la percepción que los consumidores tienen del producto y por ende su vida útil (Manzocco & Lagazio, 2009).

Los ensayos de vida útil consisten en la evaluación de las características sensoriales de un conjunto de muestras almacenadas a diferentes tiempos hasta que se alcanza un deterioro considerable en sus características sensoriales (Bishop & White, 1986). Se han descrito dos estrategias de almacenamiento y evaluación de productos para ensayos de vida útil sensorial, las mismas son el diseño de almacenamiento básico y el diseño de almacenamiento reverso (Hough, 2010).

El diseño básico es el enfoque más común y simple para realizar un ensayo de vida útil (Hough, 2010). El mismo consiste en almacenar un solo lote del producto en condiciones normales y evaluarlo a diferentes tiempos de almacenamiento (Lawless & Heymann, 2010). Aunque este método es el más común no es el más eficiente, ya que se deben realizar un número de ensayos equivalente a los diferentes tiempos de almacenamiento que se quieran evaluar, por lo cual si se considera la participación de entre 50 y 100 consumidores en los ensayos esto eleva el costo total del experimento. A su vez, para cada tiempo suelen realizarse además de las evaluaciones sensoriales, análisis fisicoquímicos del producto. Otra desventaja que presenta este diseño es que en los diferentes ensayos el panel de jueces o los consumidores cambien su criterio de evaluación (Giménez, *et al.*, 2012).

El otro tipo de diseño para realizar ensayos sensoriales de vida útil es el diseño de almacenamiento reverso, el cual consiste en evaluar en un solo ensayo muestras con diferente tiempo de almacenamiento que pertenecen a diferentes lotes, eliminando las desventajas que presenta el diseño básico (Hough, 2010). La principal ventaja del diseño reverso es que todas las muestras se evalúan el mismo día, lo cual minimiza el tiempo, el esfuerzo y los recursos necesarios para realizar el experimento (Giménez, *et al.*, 2012).

los términos de la pregunta CATA sean fácil de comprender para el consumidor y que formen parte de los términos de uso común para describir productos. Un ejemplo de preguntas CATA se muestra en la *Figura 1.8.2*. La principal ventaja que tiene este método es que no limita a los participantes a seleccionar una única respuesta, los mismos no se ven forzados a evaluar atributos específicos (Smyth, *et al.*, 2006). El número necesario de integrantes para realizar una caracterización sensorial utilizando preguntas CATA es entre 50 y 100 (Ares, *et al.*, 2010).

Esta metodología insume poco tiempo, es fácil de realizar y no resulta tediosa para el consumidor (Ares, *et al.*, 2015). Además autores como Ares, *et al.* (2010); Bruzzone, *et al.* (2012) observaron que la respuesta de los consumidores evaluando características sensoriales de alimentos era similar a la información obtenida utilizando un análisis descriptivo con un panel entrenado.

Marque todas las palabras que considere adecuadas para describir este bizcochuelo, considerando la situación que se le planteó al comienzo del estudio:

<input type="checkbox"/> Suave	<input type="checkbox"/> Aireada	<input type="checkbox"/> Liviana
<input type="checkbox"/> Se desmigaja	<input type="checkbox"/> Esponjosa	<input type="checkbox"/> Sabor extraño
<input type="checkbox"/> Blanda	<input type="checkbox"/> Seca	<input type="checkbox"/> Húmeda
<input type="checkbox"/> Sabor a naranja	<input type="checkbox"/> Dura	<input type="checkbox"/> Sabor a limón
<input type="checkbox"/> Sabor a vainilla	<input type="checkbox"/> Desabrido	<input type="checkbox"/> Dulce

Figura 1.8.2 - Pregunta CATA para bizcochuelos

1.8.2-Estadística de supervivencia

Para realizar evaluaciones de vida útil es necesario determinar un criterio de fallo o un punto de corte, el cual corresponde al máximo deterioro aceptable del producto. La vida útil se estima como el tiempo de almacenamiento en el cual el producto llega a ese nivel de deterioro, previamente determinado. Se han utilizado diferentes criterios de fallo: el aumento o el descenso en la intensidad de un atributo sensorial; vida útil definida como el tiempo necesario para alcanzar una calidad indeseable del producto; diferencia apreciable definida como el tiempo necesario para distinguir el producto evaluado del producto fresco; diferencias

significativas obtenidas de un análisis descriptivo con el producto fresco; determinar el tiempo de fracaso correlacionando información analítica y afectiva; el rechazo del consumidor a la compra del producto (Giménez, *et al.*, 2012).

Este último criterio, el rechazo del consumidor, fue el que se utilizó en el presente trabajo como criterio de fallo o punto de corte. La vida útil se estimó como el tiempo de almacenamiento en el cual el producto es rechazado por el consumidor (Giménez, *et al.*, 2012). Para estimar la vida útil utilizando el criterio anteriormente mencionado se puede utilizar el análisis de supervivencia. Este análisis consiste en un conjunto de procedimientos estadísticos que se aplican para el análisis del tiempo hasta que un hecho relevante ocurre, es muy utilizado en estudios clínicos. Cuando se aplica a estudios de vida útil, esta metodología se basa en determinar la vida útil según la probabilidad de que el consumidor rechace el producto, más que en el deterioro del mismo (Hough, *et al.*, 2003, Giménez, *et al.*, 2012).

Cuando se utiliza el análisis de supervivencia, se les presentan a los consumidores las muestras con diferentes tiempos de almacenamiento y se les pide que respondan sí o no a la pregunta “¿Ud. Consumiría este producto?”. Para el análisis de datos se define una variable aleatoria T que significa el tiempo de almacenamiento al cual el consumidor rechaza el producto. Se define la función de supervivencia $F(t)$ como la probabilidad de que un consumidor rechace el producto con un tiempo de almacenamiento menor que t , siendo $F(t) = P(T \leq t)$. La función de supervivencia puede estimarse con modelos paramétricos, siendo los más utilizados las distribuciones log normal y la distribución de Weibull (*Tabla 1.8.1*). Estas distribuciones permiten modelar el rechazo del consumidor en función de tiempo. Se selecciona la distribución que presente mejor ajuste visual de los datos. Para estimar el tiempo de vida útil se selecciona la probabilidad a la cual el consumidor rechaza el producto ($F(t)$) (Hough, *et al.*, 2003).

Tabla 1.8.1- Modelos paramétricos log normal y Weibull (Hough, *et al.*, 2003)

<p>Distribución log normal</p>	$S(t) = 1 - \Phi\left(\frac{\ln(t) - \mu}{\sigma}\right)$	<p>Φ- Distribución de función normal acumulada</p> <p>μ y σ son parámetros del modelo, que se obtienen maximizando la función de probabilidad</p>
<p>Distribución de Weibull</p>	$S(t) = S_{sev}\left(\frac{\ln(t) - \mu}{\sigma}\right)$	<p>S_{sev}- es la función de supervivencia para el extremo inferior del valor de distribución</p> <p>μ y σ son parámetros del modelo, que se obtienen maximizando la función de probabilidad</p>

Luego de elegir la distribución de la función de supervivencia, los parámetros calculados para la función de máxima probabilidad se utilizan para graficar el porcentaje de rechazo del consumidor en función del tiempo de almacenamiento del producto. Para estimar la vida útil se debe elegir un porcentaje de rechazo del consumidor ($F(t)$). Investigadores como Cardelli y Labuza (2001) utilizaron un 50% de rechazo para estimar la vida útil de café, mientras que Hough, *et al.* (2003) utilizó el mismo criterio para estimar la vida útil de yogurt. Ares, *et al.* (2006), Gámbaro, *et al.* (2006), Giménez, *et al.* (2007) utilizaron el criterio de 25% de rechazo para estimar la vida útil de productos panificados. El utilizar un criterio de 25% de rechazo significa que si un consumidor prueba el producto al tiempo en el cual se definió su vida útil o vencimiento hay un 25% de probabilidad que lo rechace y otro 75% que lo considere aún aceptable.

2-OBJETIVOS

Objetivo general

Combinar estrategias para minimizar el biodeterioro fúngico de bizcochuelos almacenados a temperatura ambiente de forma de obtener una vida útil no menor a 3 semanas.

Objetivos específicos

- Determinar la vida útil del producto almacenado en aire.
- Aislar e identificar los principales hongos causantes del biodeterioro.
- Determinar la capacidad micotoxigénica y la sensibilidad a crecer en atmósfera modificada de los hongos aislados.
- Seleccionar la especie fúngica aislada con mayor frecuencia, para realizar ensayos de crecimiento utilizando diferentes estrategias de conservación.
- Desarrollar un método de PCR en tiempo real para cuantificar el crecimiento de la especie seleccionada en los bizcochuelos en ensayos de inhibición.
- Optimizar las condiciones de producción y almacenamiento de los bizcochuelos para inhibir el crecimiento del hongo seleccionado, minimizando el agregado de aditivos químicos al producto.
- Determinar sensorialmente la vida útil de los bizcochuelos producidos y almacenados en las condiciones previamente optimizadas.

3- ESTRATEGIA DE TRABAJO

Para este trabajo se contó con el apoyo de una empresa nacional que proporcionó los bizcochuelos para cada etapa del estudio.

Se realizó el aislamiento de los hongos causantes del biodeterioro en bizcochuelos envasados en presencia de aire y almacenados a temperatura ambiente. Una vez identificados los hongos por secuenciación de la región ITS1-ITS2 y una región del gen que codifica para la beta tubulina, se evaluó la capacidad de los mismos de crecer en atmósfera modificada (ATM). Se estudió, entonces el efecto de diferentes factores sobre el crecimiento de aislamientos de la especie fúngica obtenida con mayor frecuencia (*Penicillium crustosum*), la cual es reconocida por su capacidad potencial de producir micotoxinas.

En primer lugar, para cinco aislamientos de *P. crustosum* se estudió el efecto del pH y el agregado de conservantes sobre su crecimiento. De los resultados obtenidos se seleccionó la cepa *P. crustosum* MG la cual presentó una inhibición intermedia en presencia de conservantes a pH 7 (pH del bizcochuelo). Se utilizó esta cepa para estudiar el efecto combinado de conservante a pH 7 y el envasado en ATM sobre su crecimiento. A su vez, se estudió sobre la misma cepa el efecto inhibitor de diferentes actividades de agua, combinando también el uso de esta estrategia con el envasado en ATM.

Conociendo el efecto de las variables ensayadas sobre el crecimiento de *P. crustosum* en medio de cultivo, se estudiaron las mismas variables pero en el sustrato bizcochuelo. Para esto se realizó un diseño factorial analizando cuatro variables con dos niveles cada una e incluyendo 3 repeticiones de los puntos centrales. Las variables estudiadas fueron el pH, la adición de sorbato de potasio, la atmósfera de envasado y el tiempo de almacenamiento. La actividad de agua no fue incluida como variable en el factorial, ya que su variación implicaría cambios importantes en la mezcla de preparación. La respuesta medida en el diseño factorial fue el crecimiento de *Penicillium crustosum* en los diferentes tratamientos, el cual se midió como la cantidad de ADN de *P. crustosum* cuantificada por PCR en tiempo real. Para ello se desarrolló una metodología de PCR en tiempo real diseñando primers específicos dirigidos al gen de la beta tubulina de *P. crustosum*, utilizando una cepa de *P. crustosum* de colección NRRL 968.

Finalmente se determinó la capacidad de *P. crustosum* de producir la micotoxina penitrem A en los bizcochuelos.

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de envasado, se realizó un estudio de evaluación sensorial con consumidores en las condiciones establecidas para estimar el tiempo de vida sensorial de este producto.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1- Muestreo y análisis de bizcochuelos almacenados en aire

4.1.1-Muestreo y envasado de los bizcochuelos

En el presente estudio se utilizaron bizcochuelos, los cuales se prepararon a partir de una premezcla comercial (Fleischmann, Montevideo, Uruguay), sin conservantes, elaborada a partir de harina de trigo enriquecida con hierro y ácido fólico, azúcar, leche descremada en polvo, maltodextrina, leudantes químicos (INS 500ii: bicarbonato de sodio, 450iii: pirofosfato de sodio, 341iii: trifosfato de calcio) y estabilizantes (INS 472b: ésteres (mono y di) de glicerol con ácidos grasos y ácido láctico, 471: mono y diglicéridos de ácidos grasos, 415: goma xantano o xantánica). Para la preparación también se utilizó huevo líquido pausterizado (Prodhin, Montevideo, Uruguay) y agua corriente, en las cantidades especificadas por el fabricante de la premezcla. Los bizcochuelos se prepararon y hornearon en un establecimiento comercial habilitado para simular condiciones de producción reales. Las condiciones de preparación fueron: batido de 4 minutos y horneado de 35 minutos a 190°C.

Las muestras para este estudio se tomaron de 5 lotes producidos en diferentes días. De cada lote se tomaron al azar 3 bizcochuelos, los cuales se envasaron en aire y se almacenaron a 25°C. El envasado se realizó en bolsas Cryovac T7335B coextruidas con nylon, sellador LLDPE y barrera EVOH. Se utilizó una envasadora profesional, la cual realizaba vacío previo a inyectar la mezcla gaseosa a una presión de aproximadamente 1.5 bar y posteriormente realizaba el sellado por calor (SAMMIC modelo V-410SGI). A la misma se le adaptó un filtro esterilizante de 0.2 µm a la entrada de gases. Previo al envasado se determinó para cada bizcochuelo la actividad de agua mediante AquaLab Pawkit (Decagon, Washington, USA) y el pH utilizando un electrodo de pincho (Hanna HI 9025, electrodo FC 200, Michigan, USA). Se calculó la medida promedio de actividad de agua y de pH.

En cada muestreo, uno de los bizcochuelos se analizó el mismo día de envasado para conocer la carga microbiana a tiempo cero. Los bizcochuelos restantes se almacenaron a 25°C hasta que se visualizó crecimiento fúngico en la superficie.

4.1.2-Análisis de los bizcochuelos

Recuento de mesófilos y hongos y levaduras

Para cada bizcochuelo se tomaron 3 muestras de 10 gramos de porciones donde no se visualizaba crecimiento fúngico. Cada muestra se resuspendió en 90 mL de suero fisiológico y se homogeneizó colocándola un minuto en un mezclador (Stomacher 400, Seward, UK).

Los recuentos del bizcochuelo a tiempo cero se realizaron mediante el método de número más probable (NMP) utilizando tres series de tres tubos. Los tubos de cada serie se inocularon con 1 mL, 0.1 mL y 0.01 mL del homogeneizado obtenido como se describió en el párrafo anterior. Para el recuento de mesófilos el medio de cultivo utilizado fue Tryptic Soy Broth (Difco, USA) (TSB) y para el recuento de hongos y levaduras fue Potato Dextrose Broth (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (PDB) con cloranfenicol a una concentración de 0.17 mg/mL.

En el caso de los bizcochuelos almacenados a 25°C, a los 7 y 10 días de envasados se realizaron recuentos en placa con siembra en superficie. Se sembraron 0.1 mL de la dilución del homogeneizado y dos diluciones sucesivas al décimo, en Plate Count Agar (Oxoid, Hampshire, UK) (PCA) para el recuento de mesófilos y en Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol Agar (Merk, Darmstadt, Alemania) (DRBCA) para el recuento de hongos y levaduras.

Los tubos de NMP y las placas de Petri se incubaron a 28°C por 72 horas. Los tubos que presentaban turbidez se consideraron positivos. Como el homogeneizado presentaba cierta turbidez, los tubos positivos se confirmaron mediante estriado en placa de PCA para mesófilos y DRBCA para hongos y levaduras. Los resultados de los recuentos se analizaron calculando el intervalo de 95% de confianza utilizando el programa Microsoft Excel (Versión 2013).

Aislamientos de los hongos causantes del biodeterioro

Los hongos que crecieron en la superficie de los bizcochuelos almacenados se aislaron en DRBCA. A partir de los aislamientos obtenidos se realizaron cultivos monospóricos en medio Potato Dextrosa Agar (Oxoid, Hampshire, UK) (PDA). Los cultivos puros se guardaron en tubos con medio PDA a 4°C.

4.2-Identificación de los hongos causantes del biodeterioro

Los aislamientos de los hongos causantes del deterioro, se identificaron a nivel de especie mediante secuenciación de dos regiones genómicas: la región ITS1-ITS2 y una región del gen que codifica para la beta tubulina.

4.2.1-Extracción de ADN

Cada aislamiento se inoculó en medio Yeast Extract Sucrose (Forsythe & Hayes, 2000) y se incubó a 28°C por tres días. El micelio obtenido se secó en condiciones asépticas con toallas de papel previamente esterilizadas y se molió con varilla de vidrio bajo nitrógeno líquido. La extracción de ADN de cada aislamiento se realizó según protocolo 1 de extracción de ADN (Anexo 1), a partir de aproximadamente 20 mg de micelio molido. La concentración aproximada de ADN extraído de los diferentes aislamientos se estimó en el gel de agarosa 0.8% por comparación con la intensidad de la banda de ADN en el marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA).

4.2.2-Amplificación de región ITS1-ITS2

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MultiGene Mini Personal TC020-24 (Labnet International Inc., New Jersey, USA) en un volumen de 25 µL conteniendo 2.5 µL de buffer 10X, 2.5 µL de solución de dNTPs 2 mM, 2.5 µL de solución de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de primer ITS1 de concentración 25 µM, 1 µL de primer ITS4 de concentración 25 µM, 14.4 µL de agua MiliQ estéril, 0.1 µL de la enzima Taq 5 U/µL (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) y 1 µL de ADN de concentración 7 ng/µL obtenido según 4.2.1. El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos, cada uno de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 2 minutos de hibridación a 55°C y 2 minutos de extensión a 72°C, finalizando con un paso de extensión de 10 minutos a 72°C. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de 0.8% de agarosa, utilizando como revelador el intercalante de ADN Gel Red (Biotium, California, USA). Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA).

4.2.3-Amplificación de la región de beta tubulina

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MultiGene Mini Personal TC020-24 (Labnet International Inc., New Jersey, USA) en un volumen de 25 μL conteniendo 2.5 μL de buffer 10X, 2.5 μL de solución de dNTPs 2 mM, 2.5 μL de solución de MgCl_2 50 mM, 1 μL de primer Bt-T2m-Up (de JONG, *et al.*, 2001) de concentración 25 μM , 1 μL de primer Bt-LEV-Lo1 (de JONG, *et al.*, 2001) de concentración 25 μM , 14.4 μL de agua MiliQ estéril, 0.1 μL de la enzima Taq 5 U/ μL (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA) y 1 μL de ADN de concentración aproximada 7 ng/ μL obtenido según 4.2.1. El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 3 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos, cada uno de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 90 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C, finalizando con un paso de extensión de 10 minutos a 72°C. La amplificación se verificó por electroforesis en gel de 0.8% de agarosa, utilizando como revelador el intercalante de ADN Gel Red (Biotium, California, USA). Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA).

4.2.4- Secuenciación y análisis de secuencias

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. (Seoul, Korea). Una vez obtenidas las secuencias, las mismas se analizaron por comparación en base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), aplicando el algoritmo BLAST. A su vez se realizó un árbol filogenético con las secuencias obtenidas de la región del gen de la beta tubulina para las especies de *Penicillium*. Las secuencias de las cepas de colección utilizadas en el árbol se encontraban en la base de datos del GenBank. Se utilizó el método de Neighbor-Joining, con 1000 replicados en la prueba de bootstrap y las distancias fueron computadas por el método de Jukes-Cantor. El árbol filogenético se realizó utilizando el programa MEGA 6 (Tamura, *et al.*, 2013).

4.3-Capacidad de crecimiento en atmósfera modificada de los hongos causantes del biodeterioro

Se determinó para todos los aislamientos, la relación entre el diámetro de crecimiento en aire y en atmósfera modificada N₂:CO₂ 50:50. El ensayo se realizó en placas de PDA inoculadas centralmente con un disco de micelio de los hongos en estudio. Los discos de micelio de aproximadamente 9 mm diámetro se cortaron de placas de cultivos de 48 horas de cada hongo en PDA, obtenidos mediante siembra incorporada de 2x10⁵ esporas de cada cepa en 20mL de PDA. Las suspensiones de esporas para la siembra se realizaron en suero fisiológico con 0.1% de Tween 80% y su concentración se determinó por recuento microscópico directo en cámara de Neubauer.

Las placas para estudio de influencia de la atmósfera en el crecimiento micelial se envasaron en bolsas Cryovac T7335B, utilizando la envasadora descrita en la *sección 4.1*. El envasado se realizó en aire y en ATM con una composición gaseosa N₂:CO₂ 50:50 obtenida con la mezcla *Aligal 15* (Air liquide, Montevideo, Uruguay). Luego de envasadas, las placas se incubaron a 25°C por 1 semana, determinándose el diámetro de crecimiento para cada hongo en ambas condiciones ensayadas. Los ensayos se realizaron por duplicado, determinándose el intervalo de 95% de confianza utilizando el programa Microsoft Excel (Versión 2013). En este ensayo se incluyeron las cepas de colección, *P. crustosum* (NRRL 968) y *Aspergillus flavus* (NRRL 1957).

La concentración inicial de oxígeno presente en ATM se midió para placas sin inocular mediante un analizador de gases Servomex 1400 Food Package Analyser 1450.

4.4-Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de *Penicillium crustosum* en medio de cultivo

4.4.1-Efecto del agregado de conservante a diferentes pHs

Se evaluó la capacidad de crecimiento en placa de 5 cepas de *P. crustosum* aisladas de los bizcochuelos utilizando el medio de cultivo Yeast Nitrogen Base (Difco, USA) (YNB) con 1% de glucosa y 1.5% de agar (YNBGA), en ausencia y presencia de 1000 ppm de sorbato de potasio a pH=5 y pH=7. La solución de conservante se esterilizó por filtración, con filtro de 0.2 µm y se agregó al medio de cultivo estéril. Las placas de YNBGA se inocularon con disco de micelio de *P.*

crustosum, obtenidos como se describió en 4.3. Las placas inoculadas se incubaron a 25°C por 1 semana, determinándose el diámetro de la colonia obtenida en cada caso. Los ensayos se realizaron por duplicado. A los resultados se les realizó un análisis de varianza (ANOVA), utilizando posteriormente el test de Tukey para comparar los valores de las medias, considerando 0.05 como nivel de significación. El análisis de los datos se realizó en el programa *InfoStat* (Di Rienzo J.A., et al., 2008).

4.4.2-Efecto del agregado de conservante a pH 7 y envasado en ATM

Este ensayo se realizó con la cepa de *P. crustosum* MG. Como en el caso anterior (4.4.1), el presente ensayo se realizó en placas de YNBGA utilizando el conservante sorbato de potasio a concentraciones de 0, 500 y 1000 ppm a pH 7. Las placas se inocularon con discos de micelio de *P. crustosum* MG como fue descrito anteriormente (4.3). Las placas inoculadas se envasaron en bolsas Cryovac T7335B, las mismas que fueron utilizadas para envasar los bizcochuelos en la sección 4.1.1. Para generar la atmósfera modificada se utilizó la mezcla de gases *Aligal 15* de composición N₂:CO₂ 50:50, utilizándose para el envasado la envasadora profesional con inyección de gas utilizada en la sección 4.1.1.

Las placas envasadas se incubaron por una semana a 25°C, determinándose el diámetro de crecimiento de la colonia luego de la incubación. Los ensayos se realizaron por duplicado, calculándose el intervalo de 95% de confianza en el programa Microsoft Excel (Versión 2013).

4.4.3- Efecto de la actividad de agua

Se evaluó la capacidad de crecimiento de *P. crustosum* MG de crecer a diferentes actividades de agua (a_w). Se realizó un ensayo en placa utilizando el medio YNBGA a diferentes actividades de agua (a_w), ajustadas por el agregado de glicerol al medio de cultivo (Guynot et al., 2003). Para lograr actividades de agua de 0.77, 0.84 y 0.91 fue necesario incorporar 51.4 g, 41 g y 28 g de glicerol en 100 mL de medio respectivamente. El glicerol se incorporó en forma de solución la cual fue esterilizada independientemente del medio de cultivo. El pH del medio se ajustó a 7 mediante el agregado de aproximadamente 160 μ L de una solución de NaOH 2 M. También se ajustó el pH del medio YNBGA, al cual no se le agregó glicerol mediante la adición de aproximadamente 100 μ L de la misma solución de NaOH.

Las placas de YNBGA con diferente a_w se inocularon con disco de micelio de *Penicillium crustosum* MG como se describió anteriormente en 4.3. Se envasaron en bolsas Cryovac T7335B

en aire y en ATM con una composición gaseosa N₂:CO₂ 50:50 en las condiciones ya descritas. Posteriormente se incubaron a 25°C por 1 semana. Se determinó el diámetro de crecimiento micelial para las diferentes a_w. Los ensayos se realizaron por duplicado, calculando para los mismos el intervalo de 95% de confianza.

4.5- Estudio de diferentes variables en el crecimiento de *Penicillium crustosum* en bizcochuelo

Con el objetivo de estudiar el efecto de las diferentes variables en el crecimiento de *P. crustosum* en los bizcochuelos se realizó un diseño factorial con tres repeticiones de los puntos centrales, utilizando el programa Design Expert 7.0.0. (Stat-Ease, Inc, USA). Se prepararon bizcochuelos de diferente composición, envasados en dos condiciones. Las distintas formulaciones se realizaron de acuerdo a 16 combinaciones de cuatro variables, con dos niveles cada una. Se utilizaron tres variables cuantitativas (pH, concentración de conservador sorbato de potasio y tiempo de almacenamiento) y una cualitativa (atmósfera de envasado). El ensayo incluyó también 3 repeticiones de los puntos centrales (6 en total) en ambas condiciones de envasado, con lo cual se totalizaron 22 tratamientos. Los niveles ensayados de cada variable y los correspondientes a los puntos centrales se muestran en la *tabla 4.5.1*. Todos los bizcochuelos se inocularon con *P. crustosum* NRRL 968 previo al envasado. Como respuesta se cuantificó en cada caso el crecimiento fúngico mediante PCR en tiempo real.

Tabla 4.5.1.- Variables y sus respectivos valores ensayados en el diseño factorial

	Variables	Niveles	Puntos centrales
Variables cuantitativas	pH	5.5 – 6.5	6.0
	Concentración de sorbato de potasio	0 ppm – 1000 ppm	500 ppm
	Tiempo de almacenamiento	5 días – 15 días	10 días
Variable cualitativa	Envasado	Aire / ATM N ₂ :CO ₂ 50:50	Aire / ATM N ₂ :CO ₂ 50:50

4.5.1-Preparación de los bizcochuelos

Se hornearon bizcochuelos de 7 cm de diámetro de 40 gramos cada uno, que contenían los mismos ingredientes que los bizcochuelos de 22 cm utilizadas anteriormente en este trabajo y en la misma proporción. Se realizaron tres mezclas diferentes, una sin conservador, una con 500 ppm y otra con 1000 ppm de sorbato de potasio, a las cuales posteriormente se les ajustó el pH. Para lograr la concentración adecuada de conservante se agregaron diferentes volúmenes de una solución de 12.1% de sorbato de potasio y para ajustar el pH se utilizó una solución de ácido cítrico de concentración 0.3 g/mL (Marín, *et al.* 2002). El pH inicial de la masa de los bizcochuelos era de 6.5.

Una vez realizadas las diferentes mezclas según indicaban los tratamientos en el diseño, se hornearon los bizcochuelos 15 minutos a 180°C. Posteriormente se dejaron a temperatura ambiente por 12 horas.

4.5.2-Tratamiento y envasado

Los bizcochuelos se colocaron en flujo laminar con luz UV por una hora, para eliminar los contaminantes de la superficie. Posteriormente se inocularon en forma puntual en el centro de cada bizcochuelo, con 0.1 mL de una suspensión de conidias de *P. crustosum* NRRL 968 de concentración 1×10^7 conidias/mL. Se apartaron dos bizcochuelos por tratamiento (sin inocular) para medir su pH y actividad de agua. El envasado se realizó en las condiciones descritas en 4.3 en presencia de aire o ATM según correspondiera. Los bizcochuelos envasadas se incubaron a 25°C por 5, 10 y 15 días según el caso.

4.5.3-Análisis de los bizcochuelos

Una vez cumplido el tiempo de incubación que indicaba el tratamiento se llevó a cabo la extracción de ADN para cuantificar el crecimiento de *P. crustosum*. En una primera instancia se realizó una suspensión del bizcochuelo de 7 cm de diámetro en 400 mL de agua con 0.1% Tween 80%, la cual se homogeneizó 1 minuto en un mezclador (Stomacher 400, Seward, UK). A partir de 0.2 mL de la suspensión obtenida se realizó la extracción de ADN, por duplicado según el protocolo 2 de extracción de ADN (Anexo 2).

La cuantificación de ADN de *P. crustosum* se realizó por PCR en tiempo real. Este método se puso a punto en el presente trabajo y para el mismo se diseñaron primers específicos. El mismo se describe en la *sección 4.7*.

4.5.4-Análisis de los datos

Se realizó un análisis de varianza para conocer la significancia del modelo y las variables significativas en el crecimiento de *P. crustosum*. Por medio de un gráfico de Pareto se observó el grado de significancia de las diferentes variables. A su vez, se analizaron las interacciones entre las variables y su significancia en el crecimiento del hongo en estudio. Se utilizó el programa Design Expert 7.0.0. (Stat-Ease, Inc, USA) para realizar el análisis de datos.

4.6- Crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos envasados en ATM y en AIRE

Se hornearon bizcochuelos de 7 cm como se explicó anteriormente en la *sección 4.5.1*. En este caso los bizcochuelos tenían la misma composición que los bizcochuelos analizados en la *sección 4.1.1*. El tratamiento, el inóculo y la forma de envasado se realizó como se describió en *4.5.2*, utilizando una ATM N₂:CO₂ 50:50. Los bizcochuelos envasados en ATM se almacenaron a 25°C, mientras que los bizcochuelos envasados en AIRE lo hicieron a 4°C. La concentración de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 se midió a los 4, 10, 16, 23 y 30 días de envasado. La cuantificación de ADN se realizó por PCR en tiempo real, según el método descrito en la *sección 4.7*.

4.7- PCR en tiempo real para la cuantificación de crecimiento de *Penicillium crustosum* en bizcochuelo.

Con el fin de cuantificar el crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos se desarrolló una metodología de PCR en tiempo real. Para la misma se diseñaron primers específicos y se pusieron a punto las condiciones del ciclo de amplificación. Para las condiciones seleccionadas se realizó una curva estándar a partir de ADN extraído de una cepa de colección de *P. crustosum* NRRL 968, se determinó la linealidad, el rango dinámico, el límite de detección y la eficiencia del método. Por último se estudió el efecto de la matriz bizcochuelo en el método desarrollado.

4.7.1-Diseño de primers específicos

Como primer paso se realizó la búsqueda de secuencias de diferentes especies de *Penicillium* que presentaran homología (mayor o igual a 93%) a la secuencia del gen de la beta tubulina de la cepa tipo de *P. crustosum* IMI 091917 ([AF003538](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AF003538)) aplicando el algoritmo BLAST en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilizando el programa AlleleID 7.7® (PREMIER Biosoft International, California, USA) se alinearon las secuencias seleccionadas anteriormente y se buscaron segmentos diferenciales entre las mismas y la secuencia de *P. crustosum* IMI 091917 de forma de generar primers específicos para dicha especie. Dentro de las opciones generadas por el programa se seleccionaron dos juegos de primers con las siguientes características: tamaño próximo a las 20 pb, Tm alrededor de los 60°C, contenido de bases GC aproximado a 50%, menor número de bases conservadas con respecto a la secuencias que presentaron homología con *P. crustosum* en los extremos 3', valores de ΔG superiores a -4 para las reacciones de formación de homodímeros, horquillas y heterodímeros. También se tuvo en cuenta que el tamaño del producto de amplificación obtenido con los diferentes pares de primers fuese de alrededor de 100pb. A su vez, el mismo programa realizó el algoritmo BLAST para comparar los primers obtenidos con la base de datos del GenBank, de modo de corroborar la especificidad de los mismos. Los primers seleccionados fueron sintetizados por MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

Para ambos juegos de primers se determinó la máxima temperatura de hibridación que permitiera lograr amplificación a partir de ADN de la cepa *Penicillium crustosum* NRRL 968, mediante PCR de tiempo final en un termociclador Corbett CG1_96 (Corbett Research, UK) con gradiente de temperatura. Se probó un rango de temperaturas entre 50°C y 60°C, establecido en base a la Tm de los primers diseñados y se seleccionó la máxima temperatura a la cual se obtuvo amplificación.

4.7.2-Condiciones de amplificación en PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Holanda) en un volumen de 10 μL conteniendo 5 μL de la mezcla Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Holanda), 0.5 μL de cada primer de concentración 25 μM , 3 μL de agua MiliQ estéril y 1 μL de ADN. El ciclo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de dos pasos: uno de 10 segundos de desnaturalización a 95°C y otro de hibridación-extensión de 20 segundos a 60°C. Posteriormente se realizó una curva de melting entre 68°C y 98°C. En base a los resultados

obtenidos, se seleccionó el par de primers con el cual se obtuvo el mayor valor de ciclo umbral para los blancos.

4.7.3-Curva estándar

Para la construcción de la curva estándar se realizaron diluciones seriadas en base 10 de ADN extraído de micelio de *P. crustosum* NRRL 968 (*extracción de ADN según 4.2.1*). La concentración de ADN inicial se determinó con el kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA (Invitrogen, California, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, California, USA). Se utilizaron las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente en 4.7.2. Las amplificaciones de cada dilución se realizaron por duplicado, determinándose el ciclo umbral en cada caso. El análisis de los datos se realizó en el software Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Venlo, Holanda). Se graficaron los Ct para cada dilución en función del logaritmo de la concentración, se determinó la linealidad de la curva mediante regresión lineal y se utilizó la pendiente de la misma para determinar la eficiencia de la reacción según la ecuación: $\text{Eficiencia} = [10^{-1/\text{pendiente}}] - 1$ (Dorak, 2007). En la zona lineal se definió el límite de detección y el rango dinámico.

4.7.4-Estudio de especificidad de los primers diseñados para *P. crustosum*

Para estudiar la especificidad de los primers diseñados se buscaron las especies del género *Penicillium* que presentaban alta homología (mayor o igual a 96% de identidad) en la región de la secuencia de la beta tubulina donde hibridan los primers con la secuencia de *P. crustosum*, por lo cual se aplicó a esta última el algoritmo BLAST en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se realizó una reacción de PCR en tiempo real con las condiciones descritas anteriormente para las cepas de colección *Penicillium crustosum* NRRL 968, *Penicillium expansum* NRRL 976, *Penicillium commune* NRRL 894 y *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951. Se utilizaron cantidades de ADN de 4.18×10^{-1} ng, 4.01×10^{-1} ng, 3.39×10^{-1} ng y 5.50×10^{-1} ng respectivamente, determinadas con el kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA (Invitrogen, California, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, California, USA). Se realizaron duplicados para todos los casos. Se compararon los valores de Ct obtenidos para los ADN correspondientes a cada especie.

4.7.5-Análisis del efecto matriz

Se realizaron curvas estándares de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 diluido en agua y en matriz. La matriz se obtuvo a partir de la extracción de ADN de bizcochuelos sin inocular, según el protocolo 2 de extracción de ADN (Anexo 2). Cada punto de la curva se realizó por duplicado. Se compararon los valores de Ct obtenidos para las concentraciones de ADN 5.6 ng/μL, 0.56 ng/μL, 0.056 ng/μL y 0.0056 ng/μL. Se consideran aceptables diferencias de hasta un 0.5 Ct entre el ADN fúngico diluido en agua y el mismo diluido en matriz (Cankar, *et al.*, 2006; Community Reference Laboratory for GM Food and Feed CRL-GMFF, 2008).

4.8-Estudio de producción de Penitrem A

4.8.1- Estudio en medio de cultivo

Este ensayo se realizó según el método descrito por Filtenborg, *et al.* (1983) para la detección de micotoxinas por cromatografía en capa fina (CCF). Se inoculó de forma central en placas de Petri de 60 mm, 2 μL de una suspensión de 5×10^6 esporas/mL de las cepas *P. crustosum* MG y *P. crustosum* NRRL 968, en medio Czapek Extracto de Levadura Agar (CYA) (Pitt & Hocking, 2009). El inóculo se realizó en agua con 0.2% de agar. Su concentración se determinó por recuento microscópico directo en cámara de Neubauer, por lo cual en una primera instancia se realizó la suspensión de esporas en Tween 80%. Posteriormente se tomó 1 mL de la suspensión, se centrifugó a 7000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron las esporas en 1 mL de agua con 0.2% de agar.

Las placas inoculadas se incubaron por 7 días a 25°C. Posteriormente, se cortaron discos de micelio de aproximadamente 6 mm cercanos al centro de la colonia. Los mismos se humedecieron con la solución de extracción cloroformo:metanol 2:1 (vol/vol), mediante el agregado de una gota de esta solución sobre el micelio. La siembra en la placa de Sílica (Alugram, Duren, Alemania) se realizó presionando la cara del disco de micelio que contenía a la colonia humedecida con la solución de extracción (Filtenborg, *et al.*, 1983). Al evaporarse el solvente de siembra se repitió el procedimiento con otros dos discos de micelio. Como referencia se sembró 1 μL de la solución estándar de Penitrem A (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en metanol calidad HPLC (Macron chemicals, México, México) de concentración aproximada 1 mg/mL. Como fase móvil se utilizó una mezcla hexano:acetato de etilo 6:4 (vol/vol). El revelado de la placa se realizó

mediante el asperjado con una solución de AlCl_3 20% en etanol 96% y posterior calentamiento en estufa a 120°C por 5 minutos. La toxina se observó de color azul a la luz natural.

4.8.2- Estudio en bizcochuelos

Este ensayo se realizó según una adaptación del método descrito anteriormente. Se cortaron trozos de bizcochuelo de 13 g y se colocaron en flujo laminar con luz UV por 30 minutos. Posteriormente, se inoculó sobre la corteza de los mismos 2 μL de una suspensión de 5×10^6 esporas/mL de las cepas *P. crustosum* MG y *P. crustosum* NRRL 968. Se utilizó la misma suspensión de esporas que en 4.8.1.

Los bizcochuelos inoculados se incubaron por 14 días a 25°C. Posteriormente, se cortaron trozos pequeños de aproximadamente 1 g de bizcochuelo donde había crecimiento fúngico. Dos trozos de bizcochuelos inoculados de cada hongo se apartaron para realizar el mismo tratamiento que se realizó a los discos de micelio en 4.8.1. Por otro lado, un trozo de bizcochuelo con crecimiento se colocó en un eppendorf de 2mL, se le agregó 300 μL de la solución de extracción cloroformo:metanol 2:1 (vol/vol) y se molió con varilla de vidrio. Esto se realizó para ambos hongos. De esta suspensión se sembraron 3 μL (de a 1 μL) en una placa de Sílica. La CCF se realizó y se reveló en las mismas condiciones que en 4.8.1.

A su vez de ambas suspensiones de 300 μL se tomaron 100 μL , los cuales se evaporaron y se re-suspendió el residuo seco en 5 μL con la solución de extracción utilizada anteriormente. De esta solución se sembraron 2 μL (de a 1 μL) en una placa de Sílica. La CCF se realizó y se reveló en las mismas condiciones que en 4.8.1.

4.9- Análisis sensorial para determinación de vida útil

4.9.1-Muestras

Se realizaron dos ensayos independientes, los cuales difirieron en las condiciones de envasado y almacenamiento. Los ensayos se realizaron con bizcochuelos elaborados en el mismo establecimiento donde se realizó el muestreo (*sección 4.1*). Para el **Ensayo 1**, los bizcochuelos se envasaron en atmósfera modificada $\text{N}_2:\text{CO}_2$ 50:50 y se envasaron a 25°C; mientras que para el **Ensayo 2** se envasaron en aire y se almacenaron a 4°C. El procedimiento de envasado se realizó como se describió anteriormente *en sección 4.3 y 4.1* respectivamente. Se consideraron

6 puntos de muestreo, es decir 6 tiempos de almacenamiento a los cuales los bizcochuelos van a ser evaluados. Se envasaron 4 bizcochuelos por cada punto de muestreo. Para el **Ensayo 2** sólo fue posible utilizar 4 puntos de muestreo, ya que a partir de los 26 días se comenzaron a ver hongos en la superficie de los bizcochuelos.

El diseño de vida útil sensorial se hizo en ambos ensayos en base al diseño reverso, por lo cual todas las muestras con diferente tiempo de almacenamiento fueron evaluadas el mismo día. Los tiempos de almacenamiento de cada ensayo se muestran en la *tabla 4.9.1*.

Tabla 4.9.1- Tiempo de almacenamiento (días) para las diferentes muestras envasadas en ATM y en aire

Ensayo 1: Envasado en ATM (N₂:CO₂ 50:50) y almacenado a 25°C	Ensayo 2: Envasado en aire y almacenado a 4°C
1	1
8	8
15	15
22	22
29	-----
36	-----

Los bizcochuelos utilizados fueron analizados microbiológicamente el día del ensayo. En cada caso se determinó la carga de mesófilos y de hongos y levaduras. Para ello se tomaron 10 g de cada bizcochuelo a partir de los cuales se realizaron los recuentos en placa por siembra en superficie, como se describió anteriormente en la *sección 4.1.2*.

Se identificaron tres microorganismos mesófilos presentes en los recuentos de las bizcochuelos envasados en ATM. La identificación se realizó mediante características fenotípicas observadas en microscopio óptico, tinción con Gram y por pruebas bioquímicas como Catalasa y Dnasa.

A su vez, se aisló el hongo que creció en los bizcochuelos envasados por más de 26 días en aire. El mismo se identificó mediante secuenciación de región ITS1-ITS2 como se explicó en 4.2.2. El análisis de la secuencia se realizó como en 4.2.4.

4.9.2- Panel de consumidores

Cada ensayo se realizó con un panel de 100 consumidores, los cuales fueron integrados por estudiantes, docentes y funcionarios reclutados de Facultad de Química, UdelaR. El panel de consumidores del **Ensayo 1** estuvo integrado por 74 mujeres y 26 hombres de entre 17 y 51 años de edad, mientras que el **Ensayo 2** estuvo integrado por 76 mujeres y 24 hombres de entre 17 y 52 años.

4.9.3- Procedimiento experimental

Para cada ensayo, se sirvieron aproximadamente cinco gramos de bizcochuelo en bandejas de plástico inodoras, codificadas con números aleatorios de tres cifras. Los bizcochuelos se presentaron a los consumidores en forma monádica, siguiendo un diseño de bloques completo balanceado. Los consumidores debieron probar cada una de las muestras e indicar su aceptabilidad en una escala hedónica estructurada de 9 puntos, con extremos en “me disgusta mucho” (1), “ni me gusta ni me disgusta” (5) y “me gusta mucho” (9). A continuación debieron responder “sí” o “no” a las pregunta “¿Compraría este bizcochuelo para la situación que se le planteo al comienzo del estudio?”. Finalmente los consumidores debieron utilizar la pregunta marque todo lo que corresponda (CATA) para describir características sensoriales de los bizcochuelos, seleccionando todos los atributos de una lista que consideraron adecuados para describirlos. La pregunta estuvo compuesta por 15 atributos sensoriales, seleccionados en un ensayo previo por evaluadores con experiencia en evaluación sensorial, los atributos fueron: dulce, sabor a vainilla, dura, húmeda, blanda, esponjosa, liviana, suave, aireada, se desmiga, sabor extraño, seca, sabor a naranja, sabor a limón, desabrido. La boleta de evaluación presentada se muestra en el Anexo 3.

Se utilizó agua corriente filtrada como borrador entre muestras. Las evaluaciones se llevaron a cabo en un laboratorio de evaluación sensorial, que fue diseñado según la norma ISO 8589. La evaluación se realizó con iluminación artificial, control de temperatura (entre 22 y 24°C) y circulación de aire.

4.9.4-Análisis de datos

Los análisis de datos se realizaron el software estadístico R (R Core Team, 2013).

Aceptabilidad

En cada uno de los estudios los datos de aceptabilidad se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) considerando muestra como factor fijo de variación y a los consumidores como efecto aleatorio. Se utilizó el test de Tukey para comparar los valores de las medias, considerando como nivel de significación 0.05.

Preguntas marque todo lo que corresponda (CATA)

Se calculó la frecuencia con la que los consumidores seleccionaron cada uno de los atributos para describir cada una de las muestras de bizcochuelo. Se evaluaron diferencias significativas entre las muestras en las frecuencias de uso de los términos utilizando el test Q de Cochran.

Determinación de vida útil

Para estimar la vida útil se utilizó la metodología de análisis de supervivencia. Se definió una variable aleatoria T que significa el tiempo de almacenamiento al cual el consumidor rechaza el producto. Se define la función de rechazo $F(t)$ como la probabilidad de que un consumidor rechace el producto con un tiempo de almacenamiento menor que t , siendo $F(t) = P(T \leq t)$ (Hough, *et al.*, 2003). Se eligió una distribución log normal para la variable T , por lo que la función de rechazo que expresada de la siguiente forma:

$$F(t) = 1 - \Phi((\ln(t) - \mu) \div \sigma)$$

donde Φ es la función de distribución normal acumulada y μ y σ son parámetros del modelo. En ambos estudios se seleccionó la distribución log normal para modelar el rechazo de los consumidores, ya que esta distribución fue la que mostró el mejor ajuste visual de los datos (Hough, 2010).

Los parámetros del modelo (μ y σ) se estimaron maximizando la función de probabilidad, según el procedimiento descrito por Hough, *et al.* (2003), y se graficó el porcentaje de consumidores que rechaza el producto en función del tiempo de almacenamiento (Giménez, *et al.*, 2012). El tiempo de vida útil sensorial se estimó como el tiempo en el cual el 25% y 50% de los consumidores rechazaron los bizcochuelos (Giménez *et al.*, 2012).

5- RESULTADOS

5.1- Análisis de bizcochuelos almacenadas en aire

La medida de actividad de agua promedio de los bizcochuelos fue de 0.85 ± 0.02 , mientras que la medida de pH promedio fue de 7.20 ± 0.08 .

Los bizcochuelos mostraron crecimiento fúngico visible entre los 4 y 7 días de envasados. Se observó variabilidad en los recuentos entre muestras tomadas del mismo bizcochuelo y de distintos bizcochuelos en el mismo muestreo. La carga microbiana inicial determinada por NMP, estuvo comprendida entre 23 y 93 mesófilos/g de bizcochuelo y 9.0 y 23 hongos y levaduras /g de bizcochuelo. Los recuentos de los bizcochuelos almacenados a 25°C durante 10 días mostraron una carga microbiana mínima del orden de 1.7×10^4 ufc/g y máxima de 1.6×10^6 ufc/g de bizcochuelo para mesófilos, siendo la carga microbiana mínima para hongos y levaduras del orden de 1.3×10^3 ufc/g y la máxima de 6.9×10^5 ufc/g.

5.2-Identificación de los hongos causantes de biodeterioro.

La identificación de los hongos contaminantes de bizcochuelo mostró que el 80% de los aislamientos correspondieron al género *Penicillium*, siendo *P. crustosum* la especie aislada con mayor frecuencia (35%). También se aislaron hongos del género *Aspergillus*, los cuales representaron un 15% del total. Las tres especies de *Aspergillus* se aislaron en la misma proporción. La especie *Talaromyces amestolkiae*, cuya forma de reproducción asexual es un conidióforo biverticilado del tipo *Penicillium* subgénero *Biverticillum* fue aislada con una frecuencia de 5% (Figura 5.2.1).

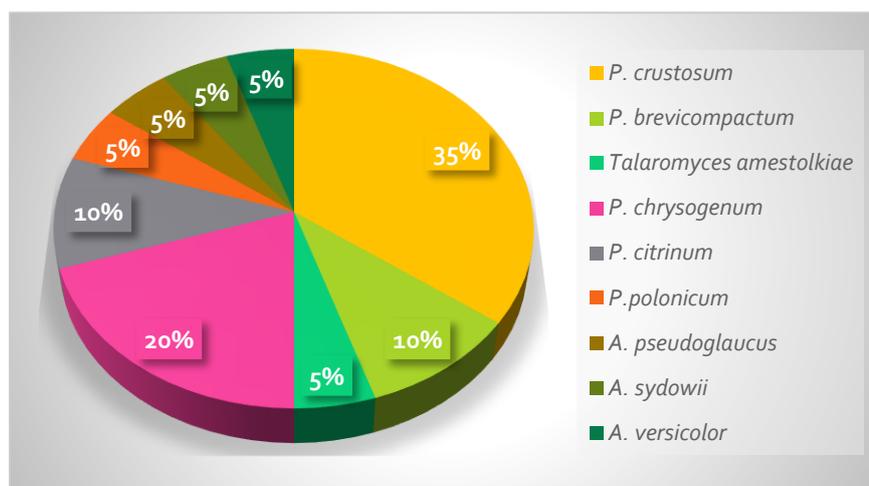


Figura 5.2.1- Porcentaje de las distintas especies fúngicas identificadas como causantes del biodeterioro en los bizcochuelos analizados

En el análisis por BLAST de las secuencias de los aislamientos se logró encontrar, en todos los casos, una similitud del 99 o 100% con secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a una determinada especie. Al realizar un árbol filogenético basado en secuencias del gen de la beta tubulina para los aislamientos del género *Penicillium*, se corroboró el agrupamiento de los diferentes aislamientos en clados junto a cepas de las diferentes especies cuyas secuencias se encontraban depositadas en el GenBank. El agrupamiento conseguido corroboró los resultados obtenidos mediante BLAST (Figura 5.2.2).

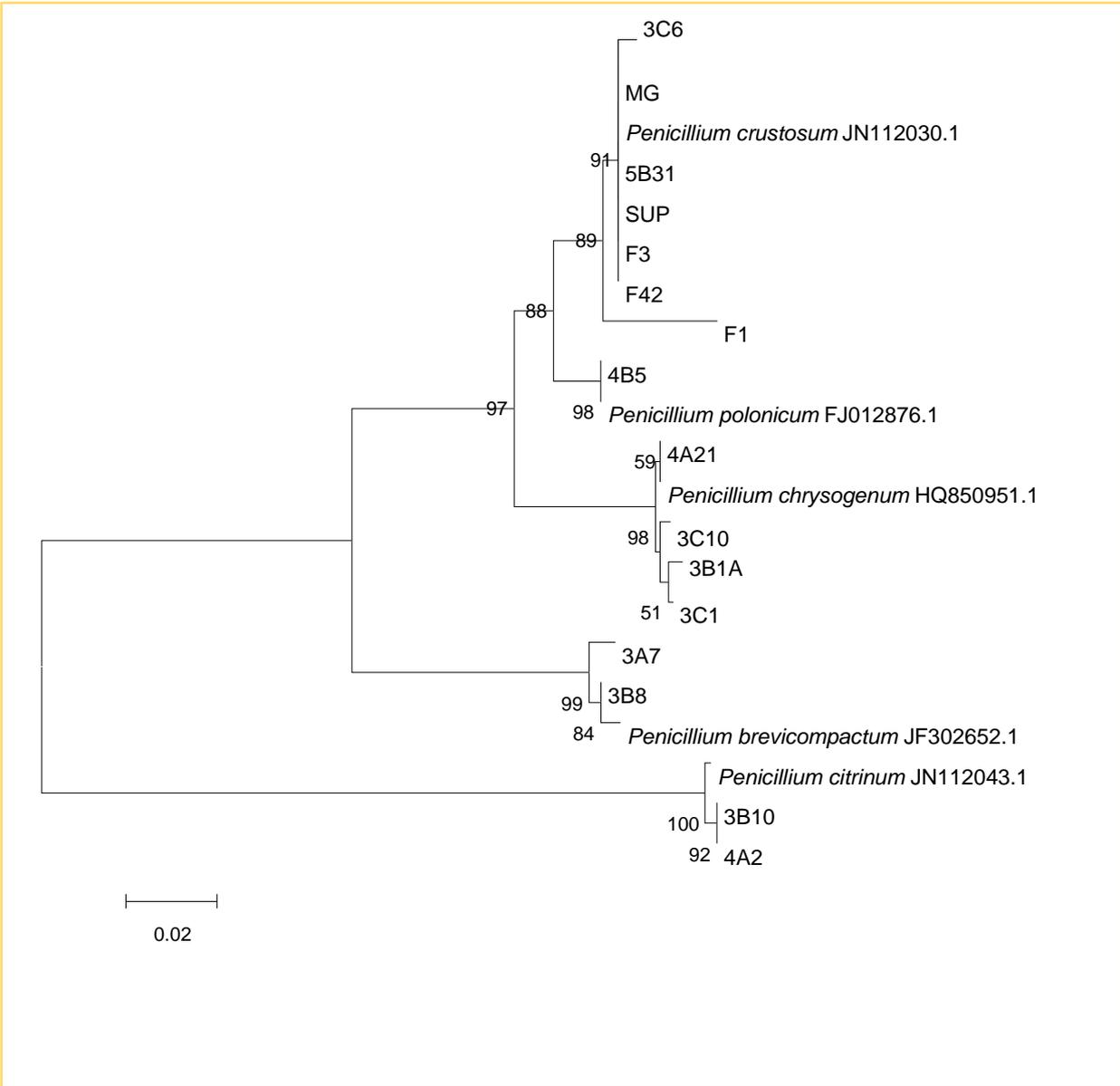


Figura 5.2.2- Árbol filogenético para el gen de la beta tubulina de *Penicillium*.

Las especies de *P. citrinum* se encuentran a una mayor distancia filogenética que el resto de las especies de *Penicillium*, ya que pertenece al subgénero *Furcatum*, mientras que el resto

pertenece al subgénero *Penicillium*. También se observa que dentro de las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium*, las especies de *P. crustosum* se encuentran a una distancia filogenética menor de las especies de *P. polonicum* con respecto a *P. chrysogenum* y *P. brevicompactum*, ya que las dos primeras pertenece a la sección *Viridicata*.

5.3-Capacidad de crecimiento en atmósfera modificada de los hongos causantes de biodeterioro

Se observó una concentración de oxígeno remanente de 1.8% dentro del envase de placas sin inocular envasadas en atmósfera modificada (*Tabla 5.3.1*).

Tabla 5.3.1- Concentración de oxígeno (O₂) medido en el envase de placas sin inocular.

<i>Atmósfera de envasado</i>	O₂ (%)
<i>AIRE</i>	20.9
<i>N₂:CO₂ 50:50</i>	1.8 ± 0.1

El crecimiento en atmósfera modificada de los hongos aislados, se expresó como porcentaje del crecimiento en aire, por comparación de los diámetros de las colonias obtenidas en las dos condiciones (*Figura 5.3.2*).

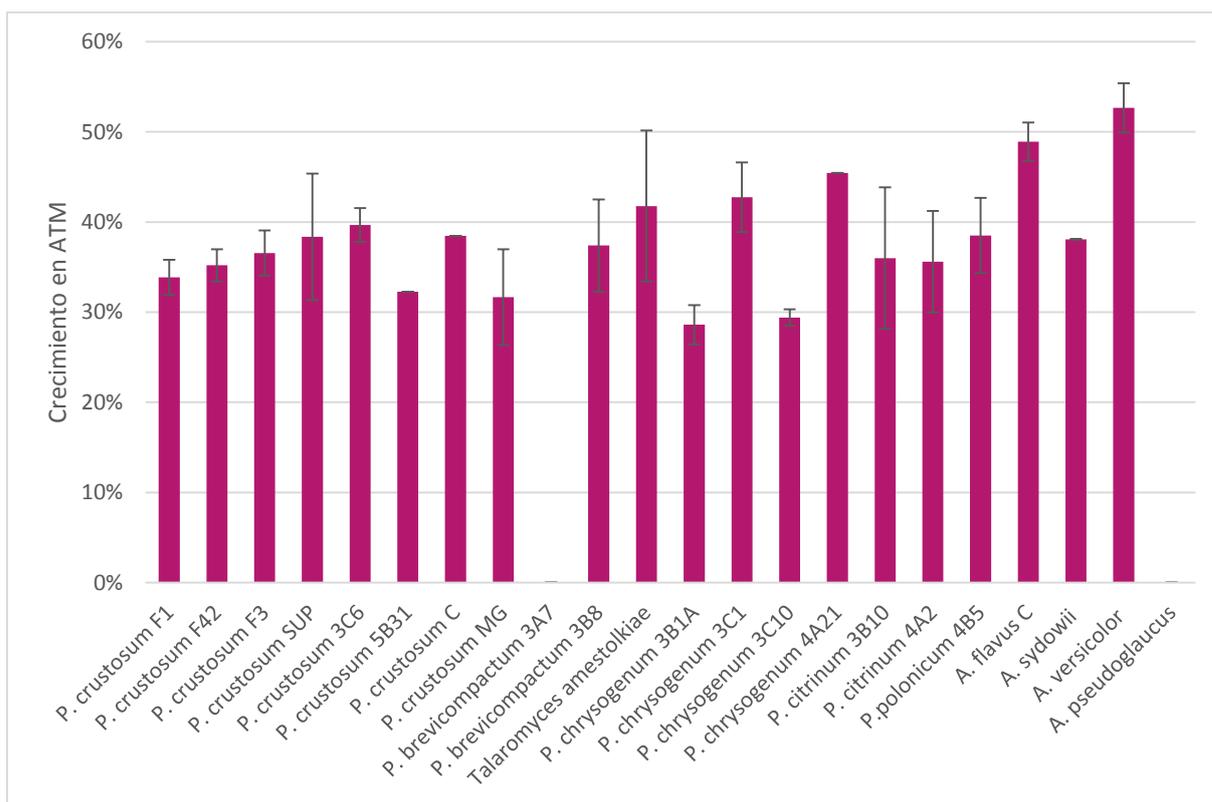


Figura 5.3.2- Crecimiento en atmósfera modificada de los hongos aislados. Las barras de error representan un intervalo de 95% de confianza.

La capacidad de crecimiento de los hongos aislados en la atmósfera de envasado ($N_2:CO_2$ 50:50) no fue homogénea (Figura 5.3.2). Los porcentajes de máximo y mínimo crecimiento en ATM respecto al crecimiento en aire fueron del 53% (*A. versicolor*) y del 0% (*P. brevicompactum* y *A. pseudoglaucus*). Para la mayoría de los aislamientos (12) el crecimiento en ATM representó entre un 30 y 40% del crecimiento en aire, mientras que en 5 de los restantes casos el porcentaje estuvo entre el 40 y 50%. En algunos casos, se evidenciaron diferencias intraespecíficas en cuanto a la capacidad de crecimiento en ATM. En el caso de los 4 aislamientos identificados como *P. chrysogenum*, dos de ellos presentaron porcentajes de crecimiento del 29% con respecto a los controles en aire, mientras que para los otros dos aislamientos el porcentaje alcanzado fue del 43 y 45%. A su vez, de los dos aislamientos identificados como *P. brevicompactum*, uno fue incapaz de crecer en ATM, mientras que el otro evidenció un crecimiento del 37% con respecto a su crecimiento en aire. En el caso de los aislamientos identificados como *P. crustosum* (especie aislada con mayor frecuencia) no se evidenciaron diferencias intraespecíficas significativas, presentando las 7 cepas aisladas porcentajes de crecimiento entre 32 y 40%. Con respecto al crecimiento en aire, valores similares se obtuvieron para la cepa de colección *P. crustosum* NRRL 968 (*P. crustosum* C) (38%).

5.4-Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de *Penicillium crustosum* en medio de cultivo

5.4.1- Efecto del agregado de conservante a diferentes pHs

El crecimiento se expresó como porcentaje del diámetro de la colonia obtenida en presencia de 1000 ppm de sorbato de potasio a pH 5 o pH 7 con respecto a la medida del diámetro de la colonia en ausencia de conservante al mismo pH (Figura 5.4.1).

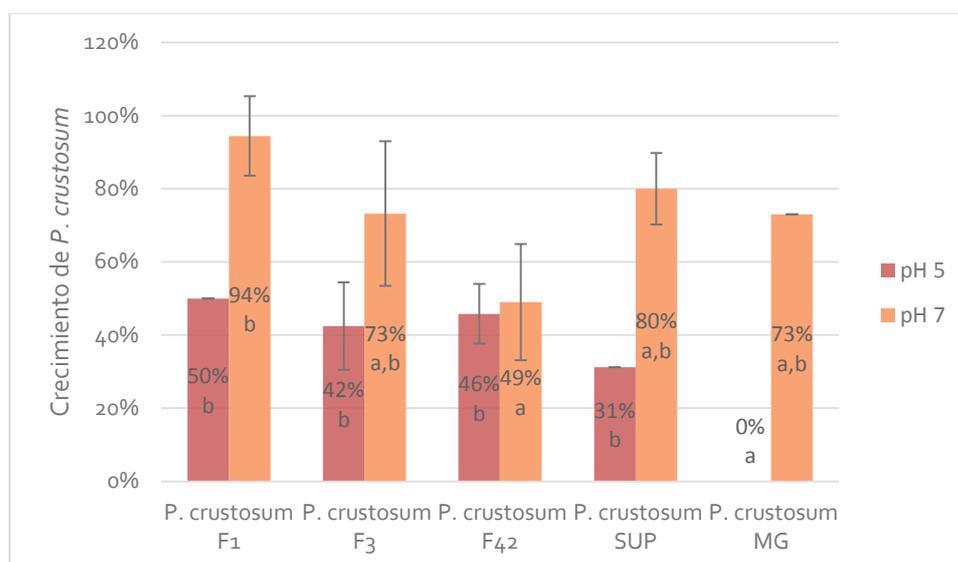


Figura 5.4.1- Crecimiento de 5 cepas de *P. crustosum* aisladas de los bizcochuelos, en presencia de 1000 ppm de sorbato de potasio a pH 5 (barras rojas) y pH 7 (barras naranja). Las barras de error representan un intervalo de 95% de confianza. Los valores de crecimiento con diferentes letras son significativamente diferentes, calculados por el test de Tukey ($\alpha < 0.05$)

Las cinco cepas de *P. crustosum* estudiadas mostraron un comportamiento similar, presentando un menor crecimiento en presencia de conservante a pH 5 que a pH 7. A ambos pHs se observaron diferencias significativas en el crecimiento, observándose que a pH 5 la cepa *P. crustosum* MG presentaba un crecimiento significativamente diferente ($\alpha < 0.05$) al resto de las cepas de la misma especie. Sin embargo, a pH 7, sólo se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de *P. crustosum* F1 y *P. crustosum* F42. Las tres cepas restantes, *P. crustosum* MG, F3 y SUP no mostraron diferencias significativas en el crecimiento entre ellas, ni con las cepas *P. crustosum* F1 y F42 (Figura 5.4.1).

5.4.2- Efecto del agregado de conservante a pH 7 y envasado en ATM

La combinación de 500 ppm de sorbato de potasio a pH 7 y el envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50 logró inhibir completamente el crecimiento de la cepa *P. crustosum* MG (Tabla 5.4.1).

Tabla 5.4.1- Diámetros de las colonias de *P. crustosum* MG bajo crecimiento de diferentes concentraciones de sorbato de potasio a pH 7, envasadas en ATM N₂:CO₂ 50:50. El error representa un intervalo de 95% confianza.

Concentración sorbato de potasio (ppm)	0	500	1000
Diámetro de la colonia (cm)	1.2 ± 0.4	0	0

5.4.3- Efecto de la actividad de agua

El crecimiento de la cepa *P. crustosum* MG se vio inhibido a actividades de agua menores a 0.91 en presencia de ATM N₂:CO₂ 50:50. En cambio, cuando se realizó el envasado en aire, la inhibición de dicha cepa se logró a a_w menores a 0.84 (Tabla 5.4.2).

Tabla 5.4.2- Diámetros de las colonias de *P. crustosum* MG a diferentes actividades de agua, envasadas en aire y en ATM N₂:CO₂ 50:50. El error representa un intervalo de 95% confianza.

Actividad de agua	Envasado	
	AIRE Diám. colonia (cm)	ATM Diám. colonia (cm)
0.99	2.2 ± 0.2	1.0
0.91	2.0 ± 0.1	0*
0.84	0*	0
0.77	0	0

*Crecimiento y esporulación en el punto de siembra

En resumen, tanto el agregado de conservante a pH 7, como la disminución de la actividad de agua limitaron el crecimiento de *P. crustosum* en ensayos en medio de cultivo. Sin embargo, para lograr la inhibición total fue necesario la combinación con el uso de ATM (Figura 5.4.2).

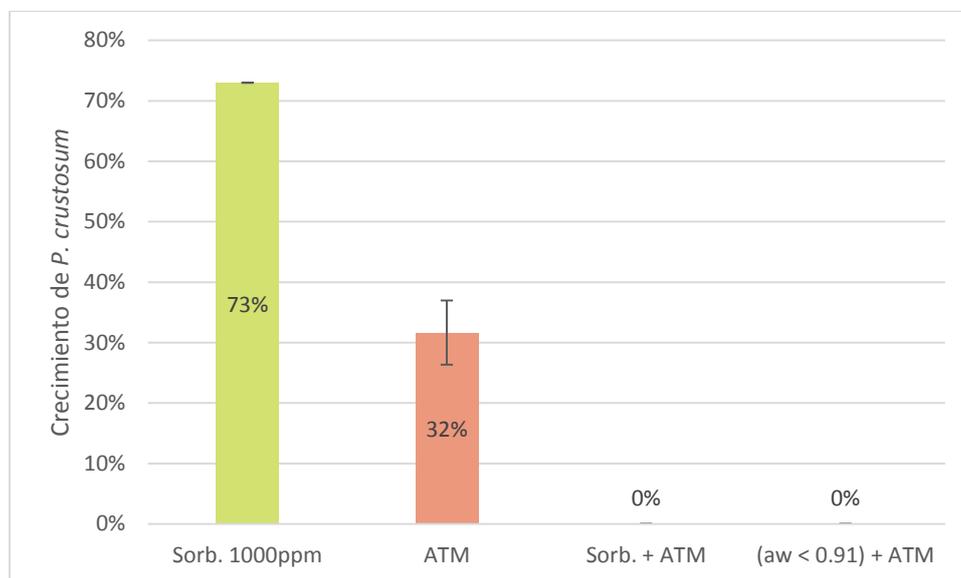


Figura 5.4.2- Crecimiento de *P. crustosum* en diferentes condiciones expresado como porcentaje respecto al control. **Sorb. 1000 ppm**- Crecimiento a 1000 ppm de sorbato de potasio a pH 7 con respecto al crecimiento sin conservante **ATM**- Crecimiento en ATM N₂:CO₂ 50:50 con respecto al crecimiento en aire. **Sorb. + ATM**- Crecimiento en presencia de 500 ppm de sorbato de potasio a pH 7 en ATM con respecto al crecimiento en ATM sin conservante. **(aw < 0.91) + ATM**- Crecimiento a actividades de agua menores a 0.91 y envasado en ATM con respecto al crecimiento a actividades de agua de 0.99 envasado en ATM

5.5- Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de *Penicillium crustosum* en bizcochuelos

La significancia de las diferentes variables en estudio sobre el crecimiento de *Penicillium crustosum* en bizcochuelos se pueden observar en el siguiente gráfico de Pareto (Figura 5.5.1). Los coeficientes cuyo valor t supera el límite de Bonferroni (línea roja superior), son muy significativos para el modelo. Los coeficientes que tienen el valor t entre el límite de Bonferroni y el límite del valor t (línea negra inferior) son medianamente significativos y aquellos cuyo valor t es inferior al límite del valor t no son significativos para el modelo (Shah & Pathak, 2010).

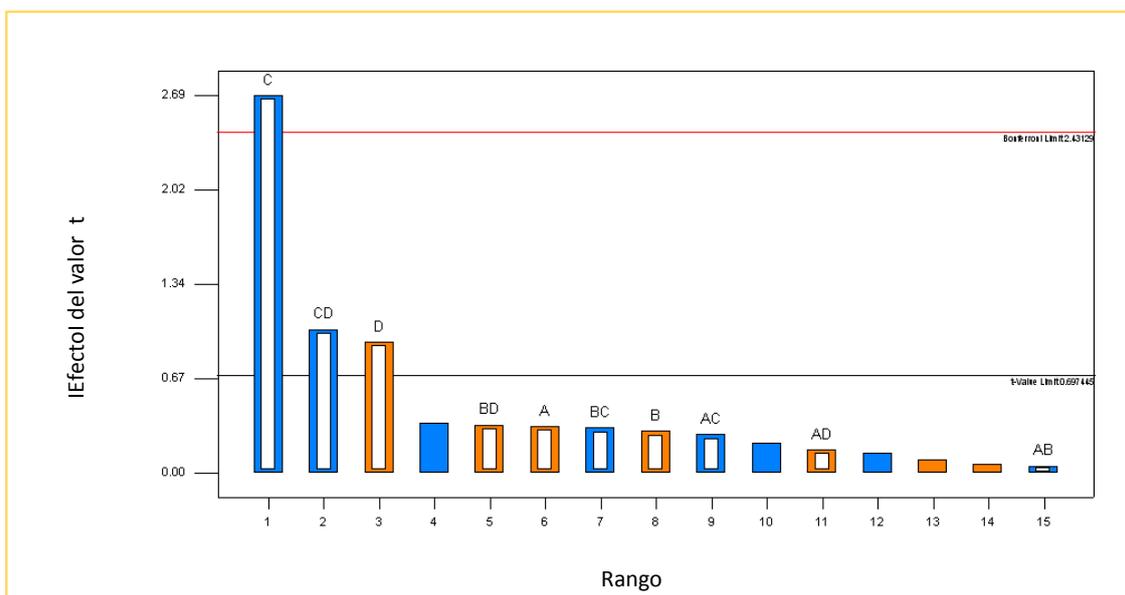


Figura 5.5.1- Gráfico de Pareto. (A-B) Variables en estudio sobre el crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos. A- pH, B- Sorbato de potasio, C- atmósfera de envasado, D- Tiempo de envasado.

Los resultados mostraron que el pH y la concentración de sorbato de potasio no influyeron en el crecimiento del hongo en estudio sobre el bizcochuelo, en el período estudiado. A su vez, se constató que las variables significativas en las condiciones del ensayo fueron las condiciones de envasado (C) y el tiempo de almacenamiento (D), así como también la interacción entre ambas (CD) la cual se muestra en la Figura 5.5.2. Se puede observar que la velocidad de crecimiento, determinada por la pendiente de la curva correspondiente, fue mayor en presencia de aire que en atmósfera modificada N₂:CO₂ 50:50.

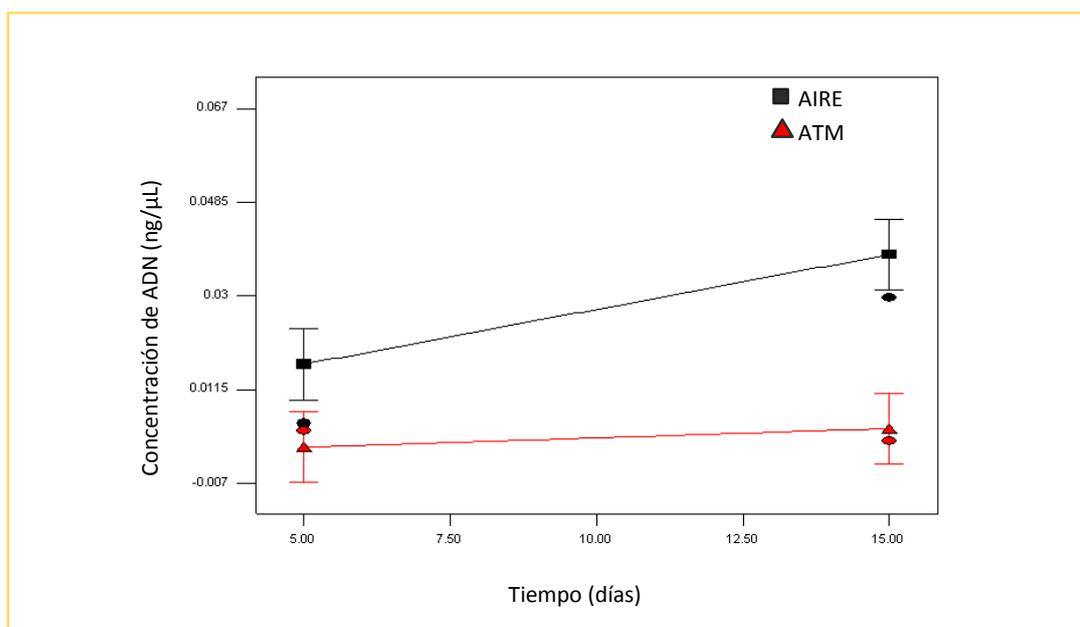


Figura 5.5.2- Concentración de ADN de *P. crustosum* en función del tiempo de almacenamiento a dos condiciones de envasado: AIRE (cuadrado, línea negra) y ATM N₂:CO₂ 50:50 (triángulo, línea roja). Los círculos corresponden a la respuesta correspondiente al modelo.

5.5.1- Crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos en ATM a 25°C y en AIRE a 4°C

La concentración de ADN de *P. crustosum* en bizcochuelos envasados en ATM N₂:CO₂ 50:50 y almacenados a 25°C se mantuvo por debajo de 7 ng de ADN/g bizcochuelo (límite de detección del método de PCR en tiempo real desarrollado) durante 30 días. Esto significa que en dichas condiciones no fue posible detectar un crecimiento del hongo en estudio. Sin embargo, en bizcochuelos envasados en aire y almacenados a 4°C se observó un aumento en la concentración de ADN del hongo a partir del día 23, lo cual demostró que en dichas condiciones fue posible el crecimiento fúngico. Es importante resaltar que este crecimiento no se detectó de forma visual inclusive hasta el día 30 (Figura 5.5.3).

En la Figura 5.5.3 se observa la evolución de la concentración de ADN de *P. crustosum* en bizcochuelo a lo largo del tiempo en presencia de aire y ATM, a 4°C y 25°C respectivamente. Se muestran los valores obtenidos en cada punto, aunque algunos de ellos fueron menores al límite de detección establecido y fueron obtenidos por extrapolación. Se puede observar que todos los valores correspondientes al envasado en ATM fueron menores al límite de detección del método. Sin embargo, en el caso de almacenamiento a 4°C en aire, a partir del día 10 se obtuvieron concentraciones por encima de dicho límite al menos en una de las repeticiones del tratamiento, lo cual se manifiesta observando el intervalo de confianza de cada punto.

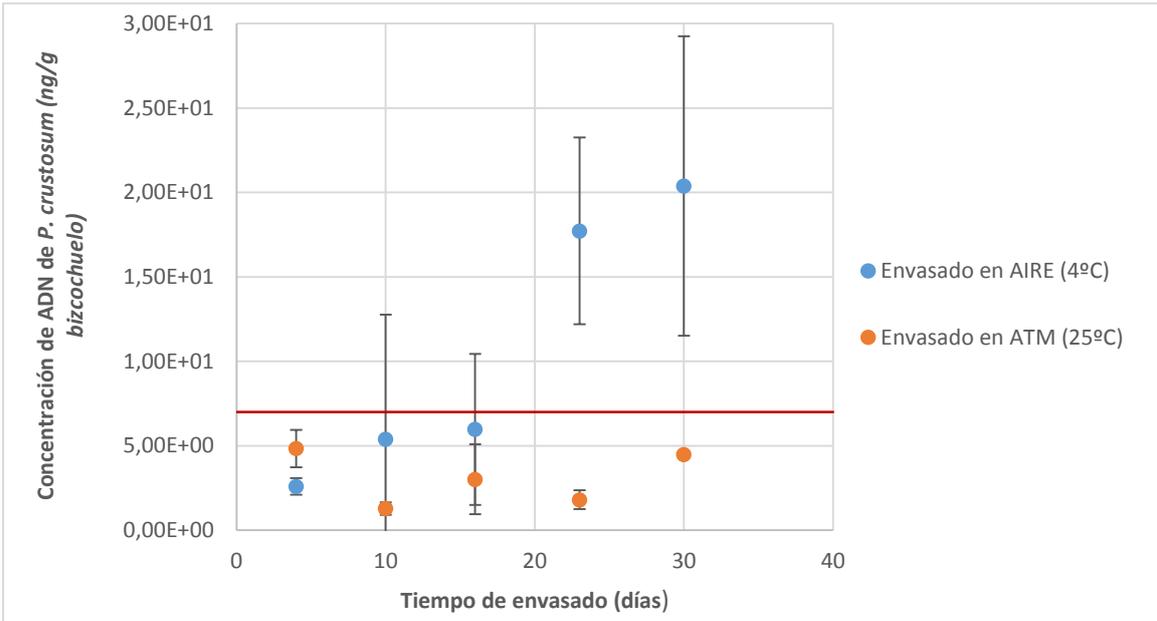


Figura 5.5.3- Concentración de ADN de *Penicillium crustosum* NRRL 968 en función del tiempo de envasado de los bizcochuelos inoculados, en dos condiciones. Condiciones de envasado en aire y almacenado a 4°C (círculos azules), condiciones de envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50 y almacenado a 25°C (círculos naranja). La línea roja muestra el límite de detección para la cuantificación de ADN.

5.6- Cuantificación de ADN de *P. crustosum* en bizcochuelos por PCR en tiempo real

5.6.1- Diseño de primers específicos

Los primers diseñados y sus características se muestran en las *tablas 5.6.1a, 5.6.1b y 5.6.2a, 5.6.2b.*

Tabla 5.6.1a- Secuencias de los Primers 1PCrus

Primers 1PCrus	
<i>Primer directo</i>	CGG TGG ATT ACA CAT CTG A
<i>Primer reverso</i>	TAT TCG GTT TCC TGT CGT T

Tabla 5.6.1b- Características de los primers 1PCrus

	Tm (°C)	Tamaño (pb)	%GC	ΔG formación de horquillas (kcal/mol)	ΔG formación de homodímeros (kcal/mol)	ΔG formación de heterodímeros (kcal/mol)	Bases homólogas en el extremo 3'
Primer directo	60.7	19	47.4	-1.3	-1.3	-1.4	4
Primer reverso	60.6	19	42.1	0.0	0.0	-1.4	1
Amplicón	78.6	112					
Blast	<i>Penicillium crustosum</i>						

Tabla 5.6.2a- Secuencias de los Primers 2PCrus

Primers 2PCrus

<i>Primer directo</i>	AGG TTC CTA ACT GGA TTA CA
<i>Primer reverso</i>	CCC CTA TCA CTG TTA AAA CTT

Tabla 5.6.2b- Características de los primers 2PCrus

	Tm (°C)	Tamaño (pb)	%GC	ΔG formación de horquillas (kcal/mol)	ΔG formación de homodímeros (kcal/mol)	ΔG formación de heterodímeros (kcal/mol)	Bases homólogas en el extremo 3'
Primer directo	59.4	20	40.0	-1.4	-1.4	-1.5	2
Primer reverso	59.4	21	38.1	0.0	-0.9	-1.5	4
Amplicón	77.6	86					
Blast	<i>Penicillium crustosum</i>						

La reacción de PCR de tiempo final con gradiente de temperatura de hibridación (51°C a 60°C) se realizó con ambos juegos de primers, utilizando 90 ng de ADN proveniente de la cepa de colección *P. crustosum* NRRL 968. Se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en todos los casos. Los blancos no presentaron bandas intensas de amplificación del tamaño de los amplicones. Sin embargo pueden apreciarse para ambos juegos de primers bandas tenues (carril 2, 9, 10, 17) de menor tamaño que el correspondiente a los amplicones. Estas bandas podrían deberse a la formación de dímeros de primers (Figura 5.6.1).

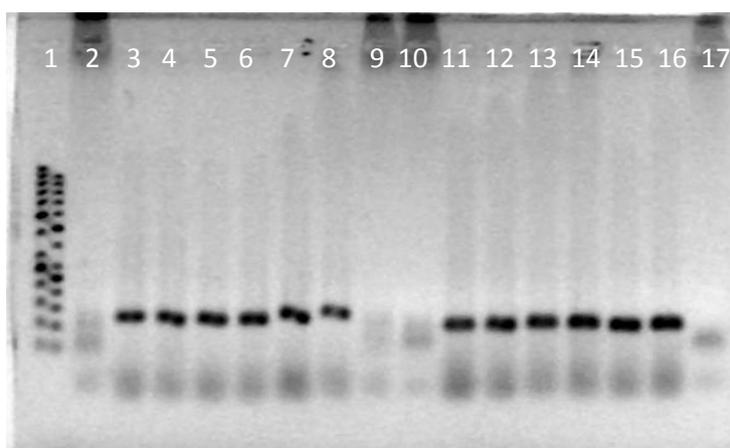


Figura 5.6.1- Gel de agarosa al 1.5%. Referencias:1-Marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). (2-9)- Productos obtenidos utilizando los primers 1PCrus. 2-Blanco a 60°C, (3-8)-Producto de amplificación obtenido a 60°C, 58.1°C, 56.3°C, 54.6°C, 52.9°C Y 51°C respectivamente. 9-Blanco a 51°C. (10-17)- Productos obtenidos utilizando los primers 2PCrus. 10-Blanco a 60°C, (11-16)-Producto de amplificación obtenido a 60°C, 58.1°C, 56.3°C, 54.6°C, 52.9°C Y 51°C respectivamente. 17-Blanco a 51°C.

5.6.2- Diseño de PCR en tiempo real

El ciclo para realizar las amplificaciones por PCR en tiempo real se diseñó utilizando como temperatura de hibridación-extensión 60°C, que fue la mayor temperatura a la cual se verificó amplificación en PCR de tiempo final (Figura 5.6.2)

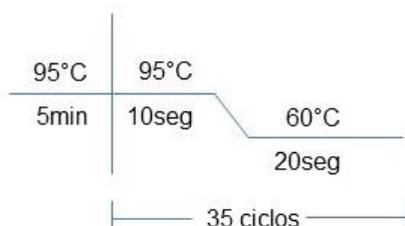


Figura 5.6.2.-. Ciclo de amplificación para PCR en tiempo real.

Utilizando el ciclo anteriormente descrito se observó amplificación de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 de concentración 90 ng/μL con ambos primers. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado para los blancos, mientras que las reacciones con ADN de *P. crustosum* se realizaron por duplicado (Figura 5.6.3 y Tabla 5.6.3).

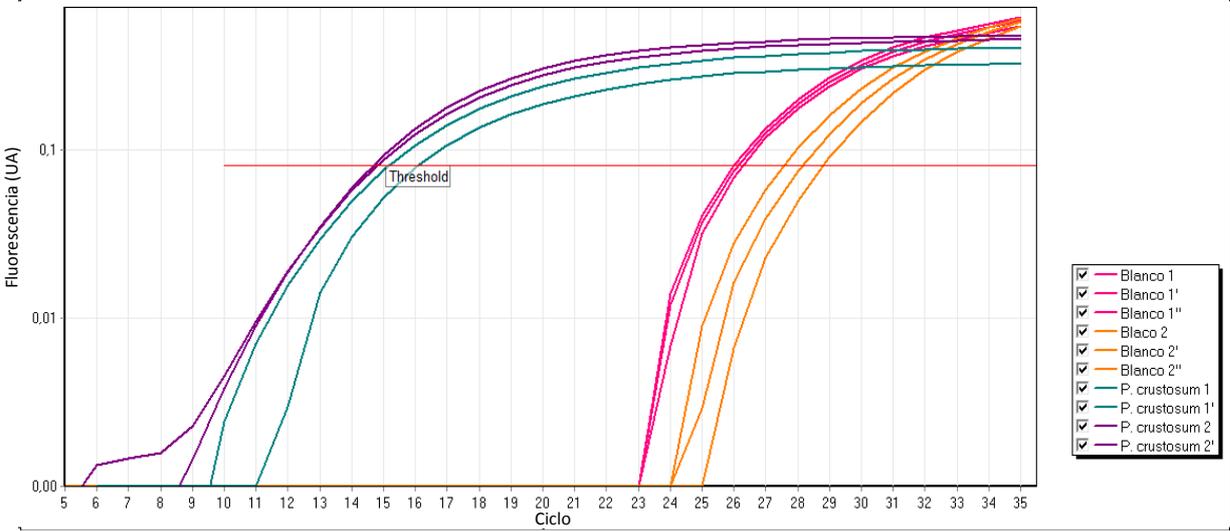


Figura 5.6.3- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para un molde de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 de concentración 90 ng/μL, amplificado con los primers 1PCrus y 2PCrus. Referencias: B1, B1', B1''- Blancos amplificados con los primers 1PCrus. B2, B2', B2''-Blancos amplificados con los primers 2PCrus. P. crustosum 1 y P. crustosum 1'- ADN de *P. crustosum* amplificado con los primers 1PCrus. P. crustosum 2 y P. crustosum 2'- ADN de *P. crustosum* amplificado con los primers 2PCrus.

Tabla 5.6.3- Valores de Ct obtenidos para las muestras amplificadas por PCR en tiempo real. 1- Muestras amplificadas con primers 1PCrus. 2- Muestras amplificadas con primers 2PCrus. Se calculó el intervalo de 95% de confianza.

Muestra	Ct promedio
Blanco 1	26.1±0.1
Blanco 2	28.1±0.7
<i>P. crustosum</i> 90ng/μL 1	15.6±0.9
<i>P. crustosum</i> 90ng/μL 2	14.7±0.1

Se obtuvieron valores de Ct bajos en las reacciones correspondientes a los blancos (Tabla 5.6.3), por lo cual se realizaron amplificaciones disminuyendo las concentraciones al medio de ambos primers en la mezcla de reacción, utilizando concentraciones de 1.25 μM. La amplificación en

los blancos se minimizó utilizando los primers 2PCrus a una concentración de 1.25 μM (Figura 5.6.4 y Tabla 5.6.4), por lo cual se seleccionó el mencionado juego de primers (2PCrus) a una concentración de 1.25 μM para continuar trabajando.

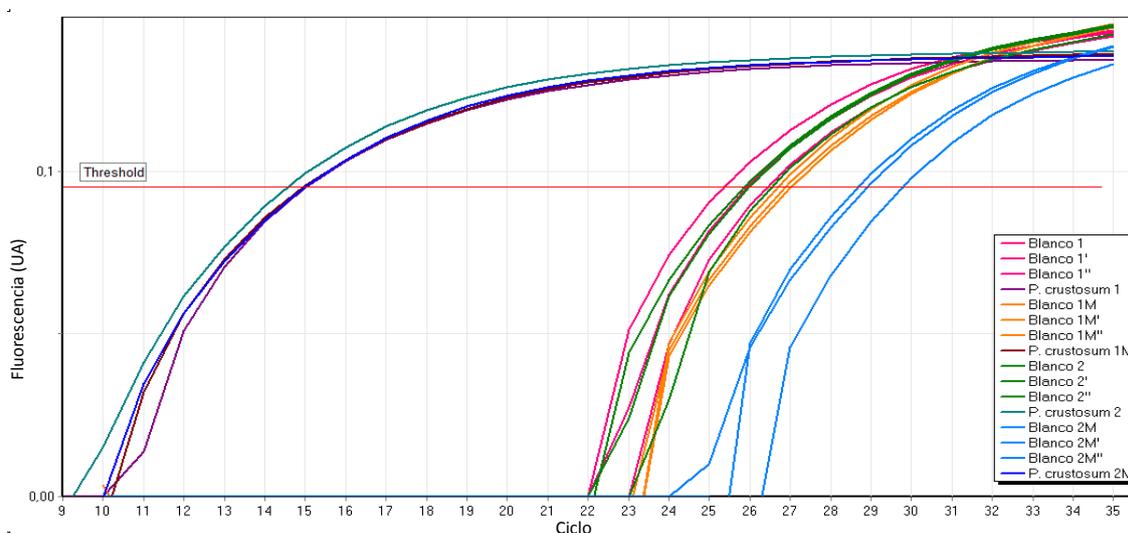


Figura 5.6.4- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para un molde de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 de concentración 51 ng/ μL , amplificado con diferentes concentraciones (2.5 μM y 1.25 μM) de los primers 1PCrus y 2PCrus. Referencias: **1**-Muestras amplificadas con primers 1PCrus. **2**- Muestras amplificadas con primers 2PCrus. **M**- concentración de primers 1.25 μM .

Tabla 5.6.4- Valores de Ct obtenidos a partir de la curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para un molde de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 de concentración 51 ng/ μL , amplificado con 2.5 μM y 1.25 μM de los primers 1PCrus o 2PCrus. No se realizaron duplicados de las reacciones con ADN. Para las reacciones de los blancos se calculó el intervalo de 95% de confianza.

Muestra	Ct promedio
<i>Blanco 1PCrus 2.5 μM</i>	25.9±1.3
<i>Blanco 1PCrus 1.25 μM</i>	26.9±0.4
<i>P. crustosum 1PCrus 2.5 μM</i>	15.0
<i>P. crustosum 1PCrus 1.25 μM</i>	15.0
<i>Blanco 2PCrus 2.5 μM</i>	26.1±0.9
<i>Blanco 2PCrus 1.25 μM</i>	29.1±1.5
<i>P. crustosum 2PCrus 2.5 μM</i>	14.6
<i>P. crustosum 1PCrus 1.25 μM</i>	15.0

5.6.3- Curva estándar

La curva de fluorescencia adquirida en función de los ciclos de amplificación muestra una diferencia de aproximadamente 3 Ct en la fase exponencial de las reacciones pertenecientes a diluciones seriadas al décimo (Figura 5.6.5). La curva estándar obtenida mostró una correlación lineal entre el logaritmo de la concentración de ADN y los valores de Ct obtenidos, con un R^2 de 1.0. Se realizaron cinco diluciones al décimo a partir de una concentración de ADN de 56 ng/ μ L para realizar la curva estándar, el logaritmo de la quinta dilución al décimo no mostró una correlación lineal con el valor de Ct obtenido. De todas formas para conocer el límite de detección del método se realizaron diluciones intermedias al cuarto, al medio y a tres cuartos de la cuarta dilución al décimo, presentando estas reacciones valores de Ct que mostraban una correlación lineal con el logaritmo de la concentración de ADN (las diluciones intermedias no se muestran en el gráfico). La ecuación obtenida de la curva estándar fue: $Ct = -3.345 \cdot \log(\text{concentración ADN}) + 17.560$. A partir de la misma se determinó la eficiencia del método, la cual fue de 99% al trabajar en el rango dinámico, el cual se estableció entre 5.6 ng y 1.4×10^{-3} ng de ADN de *P. crustosum* (Figura 5.6.6). El rango dinámico por gramo de bizcochuelo se estableció entre 2.8×10^4 ng de ADN/g bizcochuelo y 7 ng de ADN/g bizcochuelo. Las futuras cuantificaciones de ADN se realizaron trabajando en el rango dinámico establecido.

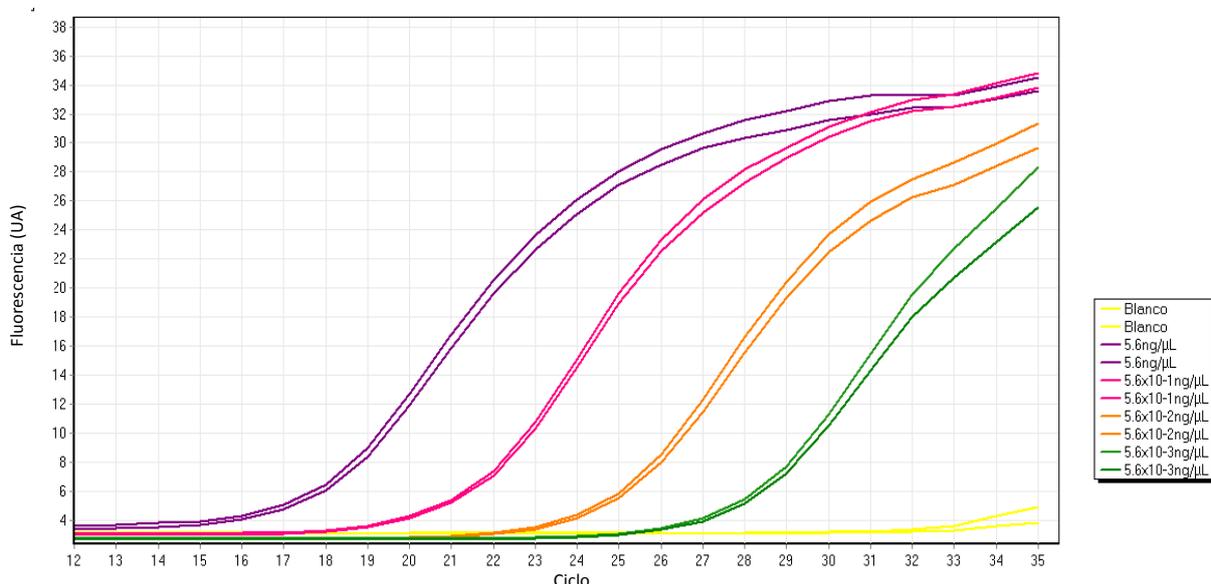


Figura 5.6.5- Curva de fluorescencia adquirida en función de ciclos de amplificación de ADN de *P. crustosum* NRRL 968.

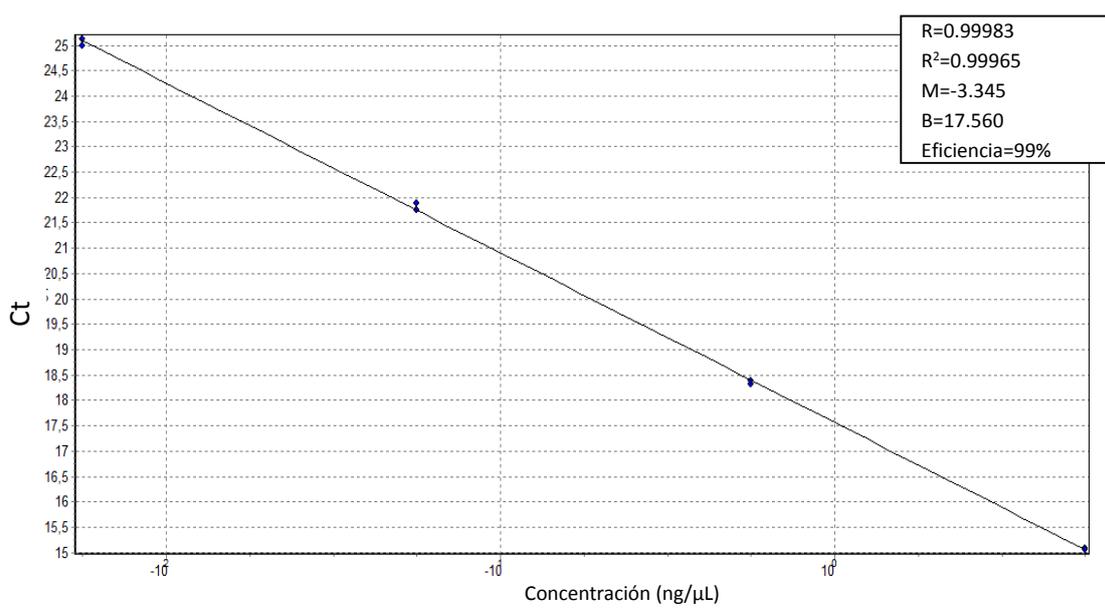


Figura 5.6.6- Curva estándar de concentración de ADN de *P. crustosum* NRRL 968 en función de los valores de Ct obtenidos. Se muestran los valores de la pendiente (B) y del coeficiente de correlación calculados mediante regresión lineal.

En la curva de melting se observa que la T_m del fragmento amplificado es de 81.8°C. No se observan productos de amplificación secundarios en las muestras y tampoco en los blancos. De esta forma se asegura que la fluorescencia obtenida en cada caso se debe exclusivamente a la amplificación de la región correspondiente a *P. crustosum* (Figura 5.6.7).

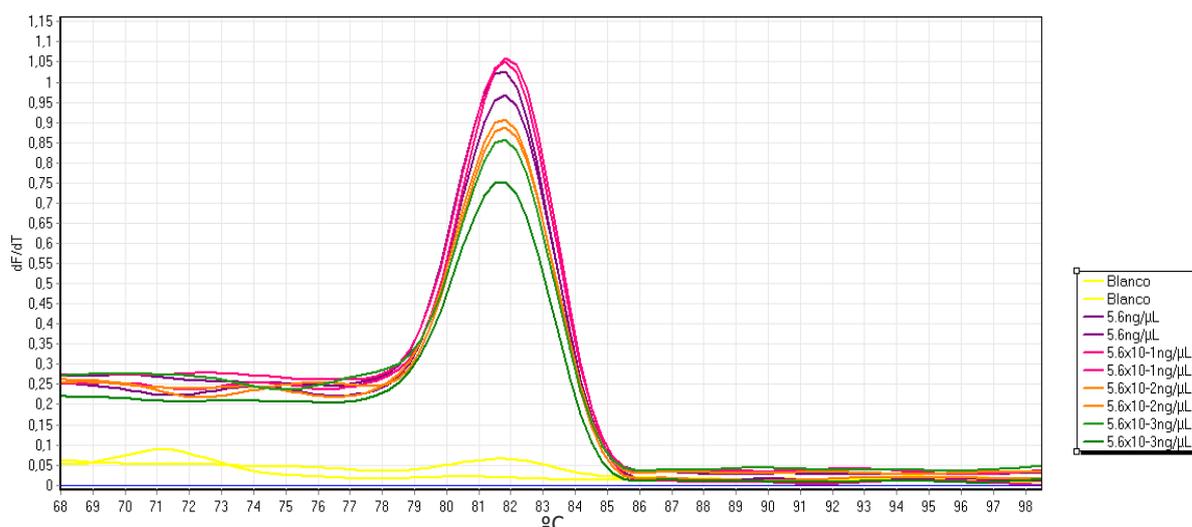


Figura 5.6.7- Curva de melting para el producto de amplificación de ADN de *P. crustosum* NRRL 968.

5.6.4- Estudio de la especificidad de los primers diseñados

Los valores de Ct obtenidos para las amplificaciones de las diferentes especies de *Penicillium* muestran que sólo hubo amplificación para la especie *P. crustosum*, ya que las otras especies estudiadas presentaron valores de Ct mayores de 30 al igual que el blanco. Por lo tanto, el presente ensayo valida la especificidad de los primers 2PCrus diseñados y seleccionados para la especie *P. crustosum* (Figura 5.6.8 y Tabla 5.6.5).

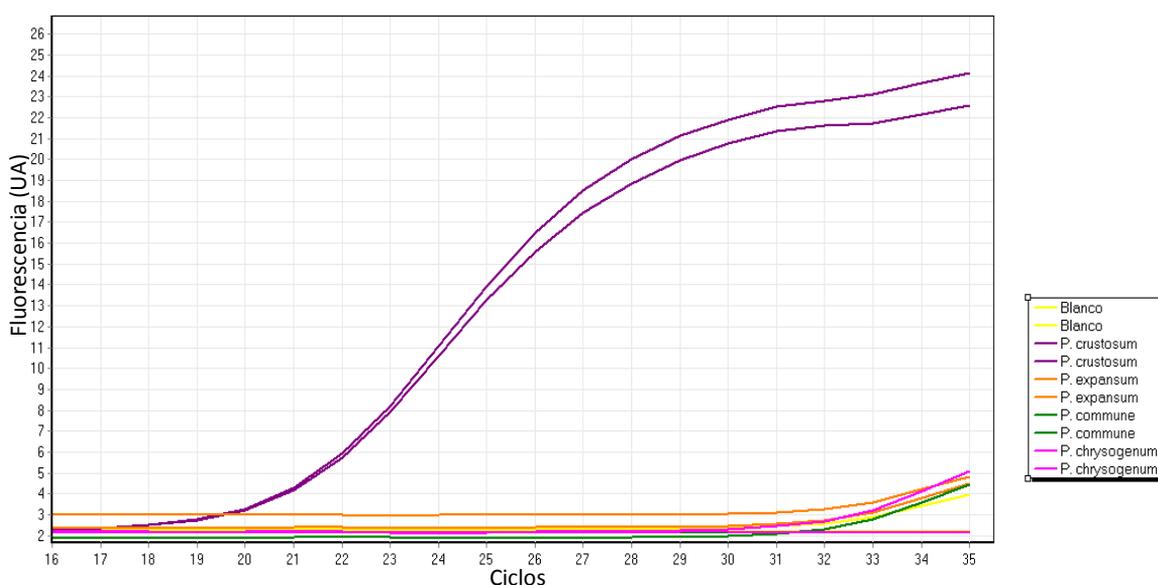


Figura 5.6.8- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diferentes especies de *Penicillium*, *P. crustosum* (4.18×10^{-1} ng), *P. expansum* (4.01×10^{-1} ng), *P. commune* (3.39×10^{-1} ng) y *P. chrysogenum* (5.50×10^{-1} ng). Las amplificaciones se realizaron por duplicado.

Tabla 5.6.5- Valores de Ct obtenidos para las muestras amplificadas de ADN de *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. commune* y *P. chrysogenum*. Se calculó el intervalo de confianza para $\alpha=0.05$.

Muestra	Ct promedio
Blanco	32.8*
<i>P. crustosum</i>	18.3±0.2
<i>P. expansum</i>	32.6±0.9
<i>P. commune</i>	31.5*
<i>P. chrysogenum</i>	31.4*

*Los duplicados no mostraron amplificación

5.6.5- Análisis del efecto matriz

Las curvas de fluorescencia obtenidas para diluciones de ADN de *P. crustosum* en agua y en matriz se muestran en la *Figura 5.6.9*, mientras que los valores de Ct obtenidos a partir de dichas curvas se pueden observar en la *Tabla 5.6.6*.

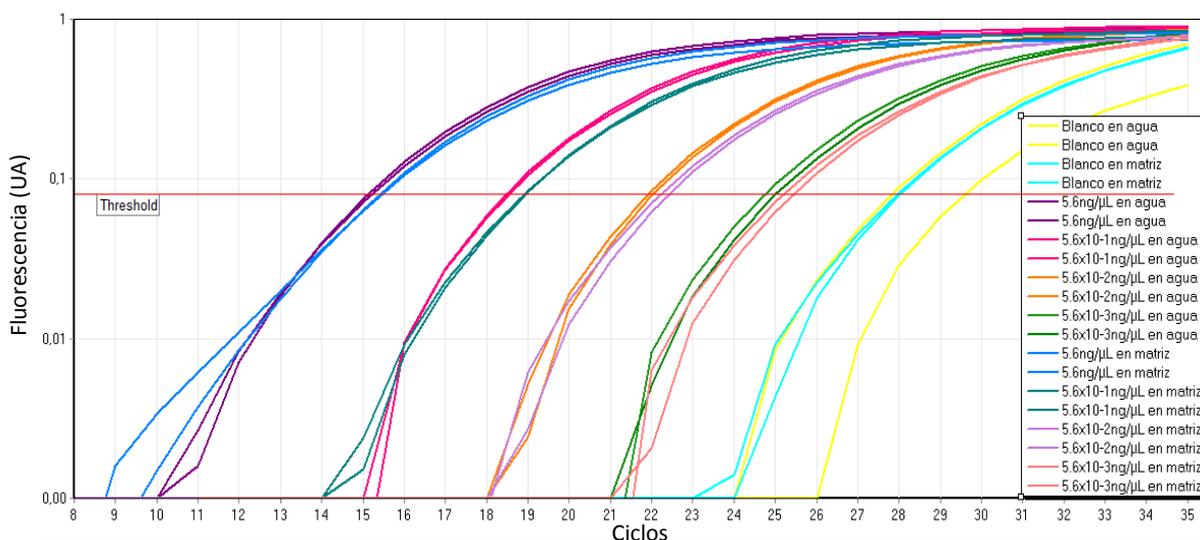


Figura 5.6.9- Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diluciones al décimo de ADN de *Penicillium crustosum* (5.6 ng, 5.6×10^{-1} ng, 5.6×10^{-2} ng, 5.6×10^{-3} ng) en agua y en matriz. Las amplificaciones se realizaron por duplicado.

Tabla 5.6.6- Valores de Ct obtenidos para diluciones al décimo de ADN de *P. crustosum* en agua y en matriz. Se calculó el intervalo de 95% de confianza.

	5.6 ng/μL	0.56 ng/μL	0.056 ng/μL	0.0056 ng/μL
Agua	15.2 ± 0.1	18.5 ± 0.1	22.0 ± 0.1	24.9 ± 0,3
Matriz	15.4	18.9	22.3 ± 0,2	25.3 ± 0.2
ΔCt	0.2	0.4	0.3	0.4

Las diferencias entre los valores de Ct (ΔCt) obtenidos para el ADN de *P. crustosum* diluido en agua y en matriz fueron menores a 0.5. Por lo tanto, de estos resultados se concluye que la matriz no interfiere en la cuantificación de ADN fúngico en el rango dinámico establecido (Cankar et al., 2006; Community Reference Laboratory for GM Food and Feed CRL-GMFF, 2004).

5.7-Estudio de producción de Penitrem A

Los resultados de la cromatografía en capa fina (CCF) muestran que las cepas *P. crustosum* MG y *P. crustosum* NRRL 968 produjeron metabolitos similares cuando crecieron en medio de cultivo CYA a 25°C durante 7 días. Uno de estos metabolitos presentó en las condiciones cromatográficas un Rf de 0.74, el mismo Rf que se obtuvo para el estándar de Penitrem A. A su vez, en todos los casos, los metabolitos revelados con solución alcohólica de tricloruro de aluminio, desarrollaron un color azul a la luz visible (Figura 5.7.1). Este ensayo confirmó la capacidad de las cepas *P. crustosum* MG y de *P. crustosum* NRRL 968 de producir penitrem A en las condiciones descritas. Sin embargo, dicha capacidad no fue evidenciada cuando ambas cepas crecieron en bizcochuelos almacenados a 25°C durante 14 días.

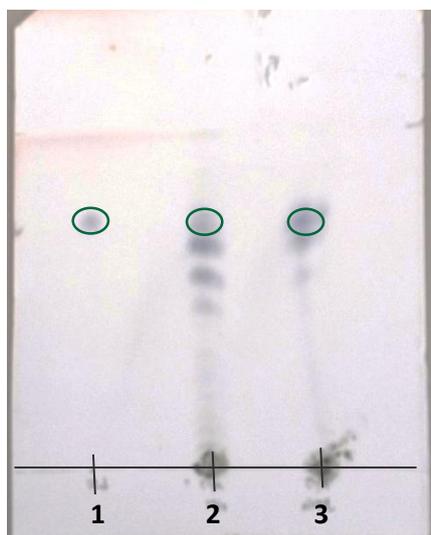


Figura 5.7.1-Resultados de la extracción de los metabolitos de *P. crustosum* MG y *P. crustosum* NRRL 968. Carriles: 1-Estándar de Penitrem A en metanol, 2-Metabolitos de *P. crustosum* MG, 3-Metabolitos de *P. crustosum* NRRL968. Los círculos resaltan el metabolito extraído que coincide en Rf con el metabolito correspondiente al estándar de Penitrem A.

5.8- Análisis sensorial para determinación de vida útil

5.8.1-Ensayo 1: Envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50, almacenamiento a 25°C

Características microbiológicas de los bizcochuelos usados en el ensayo

Los resultados de los recuentos presentaron diferencias de hasta dos órdenes de magnitud entre bizcochuelos pertenecientes al mismo tiempo de muestreo. Por ello, los resultados se expresaron como la mínima y la máxima carga microbiana presente en los bizcochuelos a los diferentes tiempos de envasado (*Tabla 5.8.1.1*).

Tabla 5.8.1.1- Recuentos de mesófilos y hongos y levaduras de los bizcochuelos evaluados en el ensayo sensorial, a los diferentes tiempos de envasado

<i>Tiempo (días)</i>	Mesófilos (ufc/g)	Hongos y levaduras (ufc/g)
1	1.0 x10 ² – 5.0 x10 ³	3.0 x10 ²
8	1.0 x10 ³ – 5.5 x10 ⁴	2.0 x10 ² – 9.0 x10 ²
15	1.0 x10 ²	1.0 x10 ²
22	1.0 x10 ² – 3.0 x10 ²	< 1.0 x10 ²
29	1.1 x10 ⁵ – 7.5 x10 ⁵	4.0 x10 ² – 6.6 x10 ⁴
36	1.2 x10 ⁵ – 2.0 x10 ⁵	6.0 x10 ⁴ – 1.0 x10 ⁵

Los resultados mostraron la heterogeneidad en la carga microbiana que presentaron los bizcochuelos para un mismo tiempo de envasado. A su vez, bizcochuelos de diferentes lotes mostraron variabilidad en la carga inicial de microorganismos lo cual se evidenció en los valores de recuentos alcanzados a los diferentes días de envasado. Es así que la carga microbiana de mesófilos en bizcochuelos envasados por 8 días fue del orden de 10³ y 10⁴ ufc/g. Mientras que en bizcochuelos de otro lote, con 15 días de envasado, tuvieron una carga microbiana del orden de 10² ufc/g. El mayor número de microorganismos mesófilos se obtuvo para bizcochuelos envasados por 29 días, con cargas del orden de 10⁵ ufc/g. Para hongos y levaduras la carga máxima fue del orden de 10⁵ ufc/g en bizcochuelos con 36 días de envasados (*Tabla 5.8.1.1*).

Los microorganismos mesófilos fueron identificados como *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Micrococcus sp.* se identificó por ser un coco Gram+

dispuesto en tétradas. Los *Staphylococcus* se identificaron por ser cocos Gram+, cuya prueba de catalasa fue positiva. La prueba DNAsa fue positiva para uno de los *Staphylococcus*, identificándose como *S. aureus*, mientras que fue negativa para el otro aislamiento identificándose como *S. epidermidis*.

Aceptabilidad

La aceptabilidad de las muestras disminuyó significativamente entre los días 1 y 8 de almacenamiento, así como entre el día 8 y los siguientes tiempos de envasado (Tabla 5.8.1.2). Las muestras correspondientes a 1 y 8 días de almacenamiento presentaron puntajes promedios de aceptabilidad superiores o iguales a 6, lo que indica, en promedio, una actitud hedónica positiva hacia los bizcochuelos por parte de los consumidores. Sin embargo, a partir de los 15 días, los valores promedio fueron inferiores a 5 (puntaje de indiferencia), lo que indica una actitud hedónica negativa. Este resultado mostró un cambio en la actitud hedónica de los consumidores hacia los bizcochuelos entre el día 8 y el día 15 (Tabla 5.8.1.2).

Tabla 5.8.1.2- Para cada tiempo de envasado se muestra la media de la aceptabilidad de los consumidores para las muestras evaluadas

Tiempo de almacenamiento (días)	Aceptabilidad
1	6.9 ^a
8	6.1 ^b
15	3.5 ^d
22	4.3 ^c
29	4.5 ^c
36	4.7 ^c

Las medias con diferentes supraíndices son significativamente diferentes, calculadas por el test de Tukey ($\alpha < 0.05$)

Pregunta CATA

Los términos que los consumidores utilizaron con mayor frecuencia para describir a los bizcochuelos fueron: dulce, blanda, esponjosa, liviana, suave, seca. Mientras tanto, los términos menos utilizados fueron sabor a naranja y sabor a limón. Estos términos fueron los únicos que no presentaron diferencias significativas entre las muestras (*Tabla 5.8.1.3*). Las demás características sensoriales de los bizcochuelos fueron significativamente afectadas por el tiempo de almacenamiento.

Los bizcochuelos con 1 día de envasados fueron descritos principalmente como dulce, con sabor a vainilla, húmeda, blanda, esponjosa, liviana, suave. La frecuencia de uso de dichas características para describir los bizcochuelos disminuyó a medida que aumentó el tiempo de envasado, mientras que aumentó la frecuencia de uso de los términos dura, se desmiga, sabor extraño, seca. Cabe destacar que se observó un cambio marcado en las características sensoriales de los bizcochuelos entre el día 8 y el 15, lo cual se manifestó en cambios en la frecuencia de selección de los términos entre el día 15 y los días 1 y 8. Un ejemplo es el término seca, el cual fue seleccionado por 4 y 25 consumidores para los días 1 y 8 respectivamente, mientras que fue seleccionado por 96 consumidores al día 15. Estos resultados pueden relacionarse con la disminución significativa de la aceptabilidad promedio entre los días 8 y 15. La frecuencia de uso de este término presentó una leve pero significativa disminución a los días subsiguientes, así como la frecuencia de uso de los términos dura y se desmiga (*Tabla 5.8.1.3*).

Estos resultados mostraron que los bizcochuelos envasados en ATM N₂: CO₂ 50:50 sufrieron cambios sensoriales a medida que transcurrió el tiempo, los cuales son percibidos por el consumidor de forma negativa.

Tabla 5.8.1.3- Frecuencia con la que los consumidores seleccionaron los atributos para describir las diferentes muestras.

Tiempo de almacenamiento	1 día	8 días	15 días	22 días	29 días	36 días
Dulce ***	52	40	22	36	31	35
Sabor a vainilla ***	42	42	21	30	31	22
Dura ***	0	1	47	22	12	24
Húmeda ***	34	18	0	2	2	6
Blanda ***	51	37	7	8	24	11
Esponjosa ***	65	61	9	20	31	17
Liviana ***	55	50	8	18	17	23
Suave ***	69	58	5	18	26	26
Aireada *	34	30	15	22	23	20
Se desmiga ***	2	12	43	38	35	30
Sabor extraño ***	3	5	18	11	12	22
Seca ***	4	25	93	79	65	71
Sabor a naranja ^{ns}	8	3	2	5	2	2
Sabor a limón ^{ns}	8	2	3	0	0	1
Desabrido ***	12	14	21	25	24	21

*** Indica diferencias significativas entre las muestras para $p < 0.001$, según el test Q de Cochran.

**Indica diferencias significativas para $p < 0.01$.

*Indica diferencias significativas para $p < 0.05$.

^{ns} Indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

Estimación de vida útil

La vida útil de los bizcochuelos estuvo limitada por los cambios sensoriales. Los parámetros de la distribución log normal fueron estimados por la función de máxima probabilidad y fueron utilizados para graficar el porcentaje de consumidores que rechaza el producto en función del tiempo de almacenamiento (*Figura 5.8.1.1*).

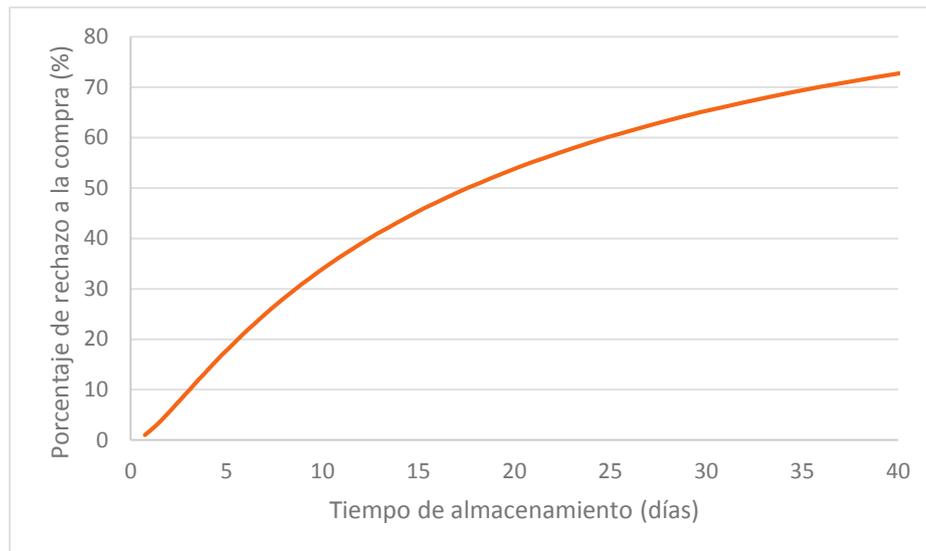


Figura 5.8.1.1- Probabilidad de rechazo a la compra del producto en función del tiempo de almacenamiento, para el modelo log normal

La vida útil sensorial se estima como el tiempo de almacenamiento en el cual se alcanza un 25% o un 50% de rechazo de los consumidores a la compra del producto (Giménez, *et al.*, 2015). En el presente estudio se alcanzó un 25% de rechazo a la compra a los 7 días de envasado, mientras que el 50% de rechazo se obtuvo a los 17 días de envasado (*Figura 5.8.1.1*). Dado que los bizcochuelos son un producto que en general se consume acompañado de diferentes rellenos como dulce de leche o mermeladas, podría estimarse la vida útil como el tiempo de almacenamiento al cual el 50% rechaza comprar el producto. Utilizando este criterio de rechazo podría estimarse una vida útil del producto de 17 días en las condiciones de envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50 y almacenado a 25°C. Sin embargo, es importante destacar que a partir de los 15 días de envasado para bizcochuelos en las condiciones mencionadas correspondió a una actitud hedónica negativa promedio por parte de los consumidores (*Tabla 5.8.1.2*). Dado este resultado, debería considerarse un rechazo de 25% para determinar el tiempo de vida útil, el cual sería de 7 días.

5.8.2-Ensayo 2: Envasado en aire, almacenamiento a 4°C

Características microbiológicas de los bizcochuelos usados en el ensayo

Como en el caso del **Ensayo 1** los resultados de los recuentos presentaron diferencias de hasta dos y tres órdenes de magnitud entre bizcochuelos pertenecientes al mismo tiempo de muestreo. Por esta razón, los resultados se expresan como la mínima y la máxima carga microbiana presente en los bizcochuelos a los diferentes tiempos de envasado.

Tabla 5.8.2.1- Recuentos de mesófilos y hongos y levaduras de los bizcochuelos evaluados en el ensayo sensorial, a los diferentes tiempos de envasado

Tiempo (días)	Mesófilos (ufc/g)	Hongos y levaduras (ufc/g)
1	$1.0 \times 10^2 - 2.0 \times 10^2$	$< 1.0 \times 10^2$
8	$1.0 \times 10^2 - 2.0 \times 10^2$	1.0×10^2
15	$4.0 \times 10^2 - 4.1 \times 10^5$	$8.0 \times 10^2 - 4.4 \times 10^4$
22	$1.0 \times 10^2 - 3.0 \times 10^2$	1.0×10^2

La carga de mesófilos se mostró constante con valores de 1.0×10^2 y 3.0×10^2 ufc/g a los días 1, 8 y 22, aumentando hasta valores de 10^5 ufc/g para uno de los cuatro bizcochuelos con 15 días de envasado. Estos resultados mostraron la heterogeneidad de la carga inicial de microorganismos que presentaron los bizcochuelos. Esta misma tendencia se observó para la carga de hongos y levaduras, la cual alcanzó valores máximos de 10^2 ufc/g a los 8 y 22 días, aumentando hasta valores de 10^4 ufc/g en el día 15. El máximo número en los recuentos tanto para mesófilos como para hongos y levaduras se alcanzó en el día 15.

El hongo aislado de las bizcochuelos envasados en estas condiciones por más de 26 días se identificó como *P. crustosum*.

Aceptabilidad

La aceptabilidad de los consumidores disminuyó significativamente con el tiempo de almacenamiento. A los días 1, 8 y 15 se obtuvieron puntajes promedio mayores o iguales a 6, lo que indica que los consumidores presentaron en promedio una actitud hedónica positiva hacia los bizcochuelos. Por el contrario, al día 22 los mismos presentaron una actitud hedónica negativa hacia los bizcochuelos, como se evidencia a través del puntaje promedio menor a 5 (correspondiente a indiferencia) (Tabla 5.8.2.2).

Tabla 5.8.2.2- Para cada tiempo de envasado se muestra la media de la aceptabilidad de los consumidores para las muestras evaluadas

Tiempo de almacenamiento (días)	Aceptabilidad
1	7.0 ^a
8	6.7 ^{a,b}
15	6.1 ^b
22	4.2 ^c

Las medias con diferentes supraíndices son significativamente diferentes, calculadas por el test de Tukey ($\alpha < 0.05$)

Pregunta CATA

Los términos más frecuentemente utilizados para describir las muestras fueron: dulce, esponjosa, liviana, suave y seca. Mientras tanto, los términos menos utilizados fueron sabor a naranja, sabor a limón y desabrida. Todos los términos, a excepción de aireada y sabor a naranja, presentaron diferencias significativas entre las muestras, lo que indica que las características sensoriales de los bizcochuelos variaron significativamente con el tiempo de almacenamiento.

Las tortas bizcochuelo con 1 día de envasados fueron descritos principalmente con los términos dulce, húmeda, blanda, esponjosa, liviana y suave. La frecuencia de uso de estos términos para describir los bizcochuelos se mantuvo hasta el día 8, disminuyendo significativamente a los 15 y 22 días. En cambio, la frecuencia del término dura, el cual no fue seleccionado a los días 1 y 8, aumentó significativamente a los 22 días de almacenamiento. Por otra parte, a partir de los 15 días aumentó significativamente la frecuencia de uso de los términos se desmiga y seca. Este último término tuvo una elevada frecuencia de uso a los 22 días de almacenamiento, siendo

seleccionado por el 73% de los consumidores. Estos resultados coincidieron con los valores de aceptabilidad antes descritos, los cuales mostraron una actitud hedónica negativa hacia los bizcochuelos a los 22 días de envasadas que podría explicarse por el aumento de la percepción de sequedad y la disminución de la sensación de humedad, característica de los bizcochuelos al comienzo del almacenamiento.

Tabla 5.8.2.3- Frecuencia con la que los consumidores seleccionaron los atributos de la pregunta CATA para describir las diferentes muestras

Tiempo de envasado	1 día	8 días	15 días	22 días
Dulce ***	60	73	60	36
Sabor a vainilla *	41	46	31	31
Dura ***	0	0	2	16
Húmeda ***	21	28	17	1
Blanda ***	44	44	38	14
Esponjosa ***	65	61	48	18
Liviana ***	55	61	46	19
Suave ***	69	66	58	20
Aireada ^{ns}	38	45	33	31
Se desmiga ***	11	21	40	55
Sabor extraño **	8	3	8	18
Seca ***	11	12	20	73
Sabor a naranja ^{ns}	5	4	4	4
Sabor a limón *	7	4	5	1
Desabrido *	8	2	7	10

*** Indica diferencias significativas entre las muestras para $p < 0.001$, según el test Q de Cochran.

**Indica diferencias significativas para $p < 0.01$.

*Indica diferencias significativas para $p < 0.05$.

^{ns} Indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

Estimación de vida útil

El tiempo de vida útil en este ensayo únicamente se pudo calcular de forma aproximada ya que solo se utilizaron cuatro puntos de almacenamiento, lo que impidió la aplicación de estadística de supervivencia. Sin embargo, los porcentajes de rechazo a la compra a cada tiempo de almacenamiento permitieron obtener una aproximación a la vida útil sensorial del producto. De

acuerdo a los resultados, se alcanzó un porcentaje de rechazo a la compra cercano al 25% a los 15 días, mientras que se superó el 50% de rechazo a los 22 días de almacenamiento (*Tabla 5.8.2.3.*). Estos resultados permitieron estimar la vida útil aproximada para las condiciones de envasado en AIRE y almacenado a 4°C en el entorno a los 19 días.

Tabla 5.8.2.4- Porcentaje de rechazo a la compra para las muestras con diferente tiempo de almacenamiento

Tiempo de envasado (días)	Porcentaje de rechazo
1	14.4%
8	9.6%
15	22.1%
22	66.3%

6- DISCUSIÓN

6.1- Biodeterioro de bizcochuelos almacenados en aire

Las medidas de pH y de actividad de agua obtenidas para los bizcochuelos concuerdan con las descritas en la bibliografía para este tipo de productos, los cuales se caracterizan por ser productos de humedad intermedia con un pH cercano a la neutralidad (Marín, *et al.*, 2002, Smith, *et al.*, 2004).

La carga microbiana inicial presente en los bizcochuelos previo al envasado fue baja. Para poder estimar el número de microorganismos presentes fue necesario recurrir a la técnica de número más probable, ya que la concentración microbiana inicial resultó, en todos los casos, menor a 100 ufc/g, límite de detección del método de recuento en placa en este caso. Los bizcochuelos envasados en aire y almacenados a temperatura ambiente permitieron el crecimiento de microorganismos mesófilos (bacterias, hongos y levaduras), cuyo número aumentó entre tres y cinco órdenes en 10 días. Los recuentos se realizaron a los 7 y 10 días de envasado pero el crecimiento fúngico comenzó a ser visible entre los 4 y 7 días.

El Reglamento Bromatológico Nacional (RBN) no establece criterios microbiológicos de aceptabilidad para este tipo de productos. Tampoco figuran dichos criterios en normativas internacionales como por ejemplo las indicadas por International Commission of Microbiological Specifications for Food (ICMSF, 1986). Sin embargo, existen en algunos países, normas que establecen requisitos microbiológicos para productos panificados con características similares a los bizcochuelos tales como masas horneadas o pasteles. La Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 para productos de panificación establece un límite de mesófilos de 1×10^4 ufc/g, mientras que la norma peruana NTS N° -MINSA/DIGESA-V.01 "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano" establece para hongos un límite máximo de 1×10^3 ufc/g. En España hasta el año 2010 estuvo vigente el Real Decreto 2419/1978 que establecía 500 ufc/g como límite máximo de hongos y levaduras para productos de repostería. El Real Decreto 135/2010 derogó parte del decreto anterior eliminando los requisitos microbiológicos para ese tipo de productos. En la actualidad en pasteles se plantean límites para micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxina A, deoxivalenol, zearalenona, fumonisinas (B1 y B2) y toxinas T-2 y HT-2, no existiendo requisitos microbiológicos.

En el presente trabajo los recuentos obtenidos a los 10 días superaron los límites establecidos en las normas mexicanas y peruanas. De todos modos, los consumidores no accederían a la compra de estos productos, ya que la aparición de crecimiento fúngico visible, como ocurrió en

este caso, provocaría indefectiblemente el rechazo del producto por parte de los mismos. Si bien los tiempos de aparición de signos visibles de contaminación fúngica fueron variables entre los diferentes lotes de bizcochuelos, la vida útil del producto almacenado en dichas condiciones no podría considerarse mayor a 4 días. Dada la variabilidad observada, sería importante estudiar el proceso de producción para encontrar los factores que determinan la aparición del biodeterioro a diferentes tiempos.

Los hongos identificados en este estudio como causantes del deterioro pertenecen en su mayoría a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Figura 5.2.1). No se aislaron hongos pertenecientes al género *Eurotium*, los cuales han sido frecuentemente identificados como responsables del deterioro de este tipo de productos panificados (Guynot, *et al.*, 2004, Dagnas, *et al.*, 2014). A su vez, uno de los aislamientos obtenidos fue identificado como *Talaromyces amestolkiae* cuya forma de reproducción asexual se da a través de un conidióforo biverticilado del tipo *Penicillium* subgénero *Biverticillum*. Esta especie es capaz de crecer a 37°C y ha sido asociado a infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Yilmaz, *et al.*, 2014). En la bibliografía consultada no se han encontrado datos previos sobre aislamientos de este género en bizcochuelos.

El 80% de los aislamientos se identificaron como pertenecientes al género *Penicillium*. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Pitt y Hocking (2009), quienes afirman que varias especies de este género son causa frecuente del biodeterioro de bizcochuelos. Entre esas especies se mencionan *P. crustosum*, *P. glabrum*, *P. commune*, *P. chrysogenum* y *P. brevicompactum*, coincidiendo en parte con lo obtenido en este trabajo, en el cual se identificaron *P. crustosum*, *P. chrysogenum* y *P. brevicompactum* como causantes del deterioro, representando respectivamente el 35%, 20% y 10% del total de los aislamientos obtenidos. También se encontraron, aunque en menor proporción, otras especies de *Penicillium*, como *P. citrinum* y *P. polonicum*. Las especies del género *Aspergillus* fueron menos frecuentes constituyendo sólo el 15% del total de los aislamientos. Dos de las especies identificadas, *A. versicolor* y *A. sydowii*, han sido descritas como contaminantes de pan de trigo (Suhr & Nielsen, 2004). Sin embargo ninguna de ellas ha sido descrita como contaminante de bizcochuelos, hasta el momento.

El inhibir o controlar el deterioro causado por hongos es importante no sólo para evitar el rechazo del consumidor ante un crecimiento fúngico visible, sino también por el riesgo a la salud que provocaría la ingesta de micotoxinas producidas por ciertos hongos contaminantes. En el presente trabajo la mayoría de las especies aisladas como contaminantes de bizcochuelos han sido descritas como productoras de micotoxinas. En particular *P. crustosum*, la especie aislada

con mayor frecuencia, es reconocida como productor de Penitrem A, una neurotoxina tremorgénica altamente tóxica (Frisvad, *et al.*, 2006).

A su vez, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. polonicum* y *P. brevicompactum* han sido descritos como productores de toxina PR, citrinina, verrucosidina y ácido micofenólico, respectivamente (Ndagijimana, *et al.*, 2008, Hidalgo, *et al.*, 2014, Jeswal & Kumar, 2015, Wigmann, *et al.*, 2015). Con respecto a las especies del género *Aspergillus* encontradas, *A. versicolor* se ha descrito como productor de esterigmatocistina (Frisvad, *et al.*, 2006) la cual tiene reconocido efecto carcinogénico (Rank, *et al.*, 2011). Sin embargo, y dado que la producción de micotoxinas es totalmente dependiente de las condiciones de crecimiento del hongo, la presencia de dichos metabolitos tóxicos debe ser estudiada en cada sustrato y condiciones ambientales de crecimiento para poder evaluar el riesgo real de contaminación.

En el presente trabajo no se detectó la producción de penitrem A por parte de dos cepas de *P. crustosum* (especie aislada con mayor frecuencia), luego de 14 días de crecimiento en bizcochuelo almacenado en aire, a temperatura ambiente. Sin embargo ambas cepas (*P. crustosum* MG y la cepa de colección *P. crustosum* NRRL 968) fueron capaces de producir la toxina cuando se cultivaron por 7 días en medio CYA a temperatura ambiente. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Kokkonen, *et al* (2005), en donde se estudió la capacidad de producción de Penitrem A por cuatro cepas de *P. crustosum* en diferentes sustratos incluido pan, mediante análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). No se detectó producción de Penitrem A en pan en ningún caso, lo cual, según los autores pudo deberse a la composición y la humedad del sustrato, las cuales no resultaron apropiadas para la producción de la toxina, que se sintetiza a mayores actividades de agua (0.92, como mínimo). Las condiciones óptimas para la producción de Penitrem A son a a_w 0.995 y temperatura entre 20 y 26°C, aunque la producción puede darse en rangos de a_w y temperatura de 0.920-0.999 y 17-30°C respectivamente (ICMSF, 1996). Lo anteriormente mencionado podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que la baja actividad de agua en los bizcochuelos analizados (0.85) limitaría la producción de Penitrem A por cepas de *P. crustosum*.

6.2-Capacidad de crecimiento en atmósfera modificada de los hongos causantes de biodeterioro

Como actualmente los consumidores están optando por productos frescos, con el menor agregado de aditivos químicos posible, la primera estrategia que se utilizó para estudiar la inhibición del crecimiento de los microorganismos causantes de biodeterioro de los bizcochuelos fue el envasado en atmósfera modificada. En ese sentido, la incubación en atmósfera de N₂:CO₂ (50:50) inhibió el crecimiento en medio de cultivo PDA de todos los hongos aislados en este trabajo con respecto a su crecimiento en aire. Los grados de inhibición fueron variables lográndose una inhibición total solamente en dos casos. Los resultados de Taniwaki, *et al* (2009) permitirían postular que quizás el crecimiento fúngico alcanzado en ATM, se debió a la concentración de O₂ remanente presente en la atmósfera del envase (1.8%). Los mencionados investigadores observaron que el crecimiento de especies toxigénicas como *A. flavus* y *P. roqueforti*, involucradas en el biodeterioro de alimentos, variaban su crecimiento en atmósfera con 40% y 60% de CO₂ (balanceadas con N₂), dependiendo de la concentración de O₂ remanente en el envase. Niveles de oxígeno cercanos al 0.5% permitieron un leve crecimiento de estos hongos, en medio PDA, lográndose la inhibición total solamente cuando los niveles de O₂ disminuyeron a concentraciones iguales o menores a 0.2%. Sin embargo, *P. commune*, otra de las especies estudiadas, mostró un comportamiento diferente a *A. flavus* y *P. roqueforti*, ya que fue incapaz de crecer en atmósferas con contenido de oxígeno menor a 0.5% y concentraciones mayores o iguales a 20% CO₂. Estos resultados muestran que las diferentes especies se ven afectadas en forma distinta por la concentración de oxígeno y CO₂ presente en el envase.

En la presente tesis se obtuvieron dos aislamientos que fueron incapaces de crecer en una atmósfera con 50% de CO₂, y un remanente de O₂ de 1.8%, mientras que los otros aislamientos (18) redujeron su crecimiento con respecto al crecimiento en aire. Para lograr atmósferas con tan bajo contenido de oxígeno, como las utilizadas por Taniwaki, *et al* (2009), sería necesario adicionar secuestradores de oxígeno, lo cual aumentaría el costo del envase, pero podría prolongar la vida útil del producto. Los sistemas tradicionales de secuestro de O₂ se basan en la disminución de la concentración del dicho gas por oxidación de limaduras de hierro a óxido de hierro o mediante reacciones enzimáticas (Ozdemir & Floros, 2004). En el primer caso, un sachet conteniendo limaduras de hierro se coloca dentro del envase. Estos sachet son muy permeables al O₂ y en algunos casos también son permeables al vapor de agua (Cruz, *et al.*, 2012). Taniwaki, *et al* (2009) en su trabajo utilizaron esta metodología para secuestrar el O₂. El segundo tipo de secuestro de O₂ se realiza mediante la reacción de una enzima con un sustrato, por ejemplo

oxidación de glucosa mediante glucosa oxidasa o de etanol a través de la enzima alcohol oxidasa (Cruz, *et al.*, 2012). Este sistema es más costoso que el de oxidación de limaduras de hierro, por el costo que tienen las enzimas utilizadas para este fin (Ozdemir & Floros, 2004). Además el uso de estos sistemas es limitado ya que presentan mayor sensibilidad a factores como la temperatura, el pH, la actividad de agua y sustratos presentes en los sachet. El uso del sistema de secuestro de O₂ está indicado para varios tipos de productos, entre ellos para tortas (Ozdemir & Floros, 2004). Por ello, esta estrategia podría ser considerada para reducir el nivel de oxígeno remanente en el envase en futuros experimentos de inhibición de biodeterioro en bizcochuelos. En particular, se seleccionaría el sistema de oxidación de hierro ya que las condiciones para la utilización son menos estrictas y los costos de los mismos parecen ser más convenientes que en el sistema basado en la utilización de enzimas.

El envasado de alimentos en atmósferas con baja concentración de oxígeno genera preocupación por la posibilidad de crecimiento de *Clostridium botulinum*, microorganismo anaerobio estricto, productor de la toxina botulínica de riesgo letal para el consumidor (Suppakul, *et al.*, 2003). Atmósferas con bajo contenido de oxígeno, hasta aproximadamente 1.2% permiten el crecimiento de la especie *Clostridium sporogenes*, que se considera el equivalente no toxigénico de *C. botulinum* Grupo I (Taniwaki, *et al.*, 2009, Carter & Peck, 2015). Se reconocen cuatro grupos dentro de la especie *C. botulinum*, el Grupo I (cepas proteolíticas) y Grupo II (cepas no proteolíticas) son los responsables del botulismo humano. *C. botulinum* perteneciente al Grupo III es el responsable del botulismo en varias especies de animales, mientras que los pertenecientes al Grupo IV no han sido asociadas al botulismo ni humano ni animal (Carter & Peck, 2015). La mínima actividad de agua que requieren las cepas del Grupo I para crecer es 0.93, mientras que para el Grupo II es 0.94 (Carter & Peck, 2015). Estudios como los de Dodds (1989) señalan que la mínima actividad de agua a la que se detectó producción de la toxina botulínica por cepas de *C. botulinum* proteolíticas fue a 0.960, no siendo detectada a actividades de agua de 0.955. Por lo tanto, el crecimiento de este microorganismo presenta una amenaza en productos de alta humedad, no siendo el caso de los bizcochuelos, las cuales son productos de humedad intermedia (a_w 0.75-0.90). Es por ello que el envasado en atmósfera modificada, para este tipo de productos se presenta como una estrategia segura, en ese aspecto.

6.3-Efecto de diferentes variables en el crecimiento de *Penicillium crustosum* en medio de cultivo

En medio de cultivo en presencia de sorbato de potasio se detectaron diferencias significativas en el crecimiento de cinco cepas de *P. crustosum* tanto a pH 5 como a pH 7. Sin embargo, todas presentaron un mayor crecimiento a pH 7. Este resultado era esperable ya que el conservante utilizado en este trabajo es un ácido débil que presenta actividad antimicrobiana en su forma no disociada, la cual predomina a valores de pH menores o iguales que su pka más una unidad (Pitt & Hocking c, 2009). El pka del ácido sórbico es 4.8, por lo cual se estima que será efectivo hasta pH 5.8. De todas formas, en el presente estudio, el sorbato de potasio a pH 7 mostró cierta actividad, ya que logró inhibir parcialmente el crecimiento fúngico, cuando se utilizó a la máxima concentración permitida por el RBN (1000 ppm). Hasan y Abdolgader (2012) también evidenciaron diferencias en la actividad antifúngica del sorbato de potasio al variar el pH del medio de cultivo. Estos autores demostraron que a pH neutro, 2000 ppm de sorbato de potasio no impidieron el crecimiento de *Penicillium expansum* y *Penicillium notatum* en medio de cultivo. Sin embargo, a pH 5, concentraciones iguales a 500 ppm fueron efectivas por un período mayor a 40 días, evidenciándose diferencias de sensibilidad entre las cepas ensayadas, a valores de pH entre 5 y 7. Estos resultados demuestran que debido a la escasa actividad antifúngica a pH7, el uso del sorbato de potasio, aún a concentraciones mayores que las máximas permitidas en nuestro país, sería inefectivo para impedir el biodeterioro en los bizcochuelos usados en este estudio. Esta comprobación es importante ya que existen a la venta en nuestro país premezclas para preparar bizcochuelos que contienen sorbato de potasio, cuya utilidad sería muy limitada en este tipo de productos de pH cercano a la neutralidad.

En la presente tesis se demostró que el uso de sorbato de potasio a 1000 ppm a pH 7 resultó menos efectivo para inhibir el crecimiento de *P. crustosum* que el envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50. La inhibición lograda con 1000 ppm de sorbato de potasio a pH 7 estuvo entre 6% y 51% para las cepas ensayadas mientras que en ATM se logró inhibir el crecimiento micelial de las mismas entre un 60% y 70%. Sin embargo, los estudios combinando el envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50 con la adición de sorbato de potasio a pH 7 mostraron que se logró inhibir completamente el crecimiento de *P. crustosum* MG, aún a una concentración de 500 ppm. Por otro lado, el uso combinado de ATM N₂:CO₂ 50:50 con bajas actividades de agua, también resultó efectivo. En ATM se logró impedir el crecimiento de *P. crustosum* MG a a_w menores a 0.91, mientras que en AIRE la inhibición total sólo fue posible a 0.84. Estos resultados pueden correlacionarse con los resultados obtenidos por Guynot, *et al* (2003). Los autores demostraron que la actividad de agua

tiene una influencia significativa en el crecimiento fúngico y que determina la concentración de CO₂ necesaria, en la ATM de envasado, para prevenir el biodeterioro en bizcochuelos. A su vez, observaron que combinando a_w menores a 0.85 con un envasado en una ATM N₂:CO₂ 50:50, se podía impedir el crecimiento de cepas aisladas de productos panificados identificadas como *A. flavus* y *P. corylophilum*, mientras que a la misma a_w ambas cepas eran capaces de crecer en presencia de aire.

La combinación de estrategias como el envasado en ATM con la adición de sorbato de potasio o la disminución de la actividad de agua fueron exitosas para impedir el crecimiento fúngico. Esto es un ejemplo del “efecto barrera” conocido en inglés como “hurdle technology” el cual se basa en que los alimentos se mantienen aptos para su consumo debido al efecto combinado de varios mecanismos actuando en simultáneo y no solamente por el uso de una sola estrategia de conservación (Berk, 2013).

6.4- Estudio del efecto de diferentes variables en el crecimiento de *Penicillium crustosum* en bizcochuelos

Los factores significativos en el crecimiento de *P. crustosum* NRRL 968 en bizcochuelos fueron la condición de envasado y el tiempo de almacenamiento, siendo también significativa la interacción entre ambas. El pH y la concentración de sorbato de potasio no fueron significativos, lo cual afirmó que el agregado de conservante no resultaba útil en impedir el desarrollo fúngico en los productos estudiados. Guynot, *et al.* (2004) realizaron estudios similares sobre el crecimiento de especies de *Eurotium* (*E. amstelodami*, *E. herbariorum*, *E. rubrum*, *E. repens*) en bizcochuelos combinando los factores: actividad de agua, pH, concentración de sorbato de potasio y ATM. Los resultados de dicho estudio mostraron que todos los factores fueron significativos para el crecimiento de especies de *Eurotium*, así como también las interacciones entre ellos. Observaron que todas las combinaciones de sorbato de potasio y ATM fueron más efectivas a pH 6 que a pH 7.5. También se observó que a medida que aumentaba la a_w era necesario aumentar la concentración de sorbato de potasio o la concentración de CO₂ en la ATM para prevenir o retrasar el crecimiento fúngico. Los autores mencionaron que la concentración de sorbato de potasio podía reducirse si los bizcochuelos se envasaban en una ATM adecuada. De esta forma, lograron impedir el crecimiento de los hongos estudiados a pH 6 y 7.5 utilizando una mezcla de gases con contenido de CO₂ mayor a 70 %, según la a_w del producto, en ausencia

de sorbato de potasio. Se estableció que para una a_w 0.85 se necesitaba una mezcla de gases con 70% CO_2 balanceada con N_2 , mientras que para productos con a_w 0.90 se necesitaba una atmósfera compuesta de 100% CO_2 .

Como se mencionó anteriormente, los bizcochuelos utilizados en esta tesis, presentaban una a_w de 0.85. La actividad de agua no fue una variable de estudio en este caso, ya que su variación seguramente cambiaría las características sensoriales del producto, las cuales se buscaba mantener. Para modificar la actividad de agua del producto podría agregarse glicerol. Actualmente, existen a la venta premezclas para preparación de este tipo de productos que contienen glicerol. Un ejemplo de ellas son las premezclas de origen Israelí "Penta Cake" para la preparación de bizcochuelos, la cuales, contienen 3% de glicerol.

A diferencia de lo concluido por Guynot, *et al.* (2004), en la presente tesis se observó que para impedir el crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos era suficiente envasar los mismos en una ATM $\text{N}_2:\text{CO}_2$ 50:50. Las diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse a que los hongos utilizados en ambos estudios eran diferentes. Estudios de los mismos investigadores sobre otros contaminantes fúngicos como *A. flavus* y *P. corylophilum* mostraron que su crecimiento era inhibido en bizcochuelos con a_w de 0.85 a pHs 6 y 7.5, si las mismas se envasaban en una ATM $\text{N}_2:\text{CO}_2$ 50:50 (Guynot, *et al.*, 2003).

Comparando los resultados obtenidos para los ensayos de envasado en ATM en medio de cultivo con los resultados en bizcochuelos, se puede concluir que una de las variables que permitió el crecimiento de los hongos en medio PDA fue la elevada a_w , la cual es 0.995 (Lahlali, *et al.*, 2006). Se confirma de esta forma, la importancia de la combinación de estrategias para inhibir el biodeterioro de alimentos.

El estudio de crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos envasados en ATM $\text{N}_2:\text{CO}_2$ 50:50 y almacenados a 25°C por 30 días mostró que no había crecimiento fúngico en ese período de tiempo. Sin embargo, bizcochuelos inoculados con *P. crustosum* envasados en AIRE y almacenados a 4°C mostraron un aumento en la concentración de ADN del hongo en estudio a partir del día 23, aunque este crecimiento no era visible. Estos resultados mostraron que el envasado en ATM es una mejor estrategia que el almacenamiento en frío (4°C) para impedir el crecimiento fúngico durante 30 días. Además el uso de ATM permitiría la comercialización del producto a temperatura ambiente, evitando los costos asociados al mantenimiento de la cadena de frío.

6.5- PCR en tiempo real para la cuantificación de crecimiento de *Penicillium crustosum* en bizcochuelos

En la presente tesis se decidió utilizar el gen de la beta tubulina para realizar el diseño de primers específicos para poder cuantificar *P. crustosum* por PCR en tiempo real. Esta decisión se basó en que dicha región contiene la variabilidad necesaria para diferenciar especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium* (Samson, *et al.*, 2004), mientras que otras regiones como la ITS1-ITS2 presentan ambigüedades en ciertos casos.

Los dos juegos de primers diseñados, amplificaron ADN de *P. crustosum*. Se seleccionó el juego de primers 2PCrus ya que fue el que presentó menos interacciones inespecíficas. Estas interacciones podían visualizarse en la amplificación de las reacciones de los blancos, aun utilizando bajas concentraciones de primers. El juego de primers seleccionado mostró especificidad, ya que no amplificó especies de *Penicillium* con un porcentaje de homología igual o mayor al 96% en la región del gen de la beta tubulina con *P. crustosum*.

El método de PCR en tiempo real diseñado obtuvo un límite de detección de 1.4×10^{-3} ng de ADN. Los resultados obtenidos mostraron que el método diseñado permitió la cuantificación de bajas cantidades de ADN comparado con otros trabajos. Por ejemplo, en trabajos como el de Arquiza & Hunter (2014), en el cual se diseñó un método de PCR en tiempo real para la amplificación de *P. chrysogenum* se obtuvo un límite de detección de 0.76 ng de ADN. Mientras que en el método desarrollado para la detección y cuantificación de *P. expansum* se obtuvo un límite de detección de 0.1 ng ADN (Tannous, *et al.*, 2015). Un límite de detección bajo como el logrado en el presente trabajo es importante ya que permite detectar y cuantificar cambios en bajas cantidades de ADN. Lo mencionado anteriormente es fundamental cuando se trata de especies causantes de biodeterioro, ya que un aumento de crecimiento del hongo puede ser detectado antes de que los signos de biodeterioro sean visibles. Esto es aún más relevante cuando se trata de especies productoras de micotoxinas.

6.6- Determinación de vida útil

Los bizcochuelos envasados en ATM N₂:CO₂ 50:50 y en AIRE (4°C) permitieron el crecimiento de microorganismos mesófilos (bacterias, hongos y levaduras). Sin embargo, ambas estrategias retrasaron el crecimiento microbiano en comparación a lo obtenido en bizcochuelos almacenados en aire a 25°C. En esta última condición se alcanzó una carga de mesófilos del orden de 10⁵ ufc/g a los 10 días de envasado, apareciendo crecimiento fúngico visible en la superficie del bizcochuelo entre los 4 y 7 días. En ATM la misma carga de mesófilos se alcanzó recién a los 29 días, no detectándose signos visibles de crecimiento fúngico en el ensayo (36 días). A su vez, en los bizcochuelos almacenados en AIRE a 4°C la carga de mesófilos no superó el valor de 10³ ufc/g, salvo en una de las 4 muestras tomadas a los 15 días de envasado. En dicha muestra la carga de mesófilos obtenida fue de 10⁵ ufc/g, lo cual confirma las diferencias ya comentadas, en la carga microbiana de los bizcochuelos, inclusive en los pertenecientes al mismo lote. En los bizcochuelos almacenados en las mencionadas condiciones se observó crecimiento fúngico visible a partir del día 26, por lo cual los dos puntos de muestreo, días 29 y 36, debieron ser descartados. Estos resultados concordaron con los obtenidos en el estudio de crecimiento de *P. crustosum* en bizcochuelos envasados y almacenados en las mismas condiciones por 30 días. En el mencionado estudio se observó un incremento en la cantidad de ADN de *P. crustosum*, después de 23 días de envasado, mientras que no se detectó crecimiento en ATM a 25°C durante todo el ensayo.

De acuerdo a estos resultados, desde el punto microbiológico, la vida útil de los bizcochuelos almacenados en aire a 25°C, sería menor a 4 días. Este valor aumentaría a 18 días para los bizcochuelos envasados en ATM N₂:CO₂ 50:50 y en AIRE (4°C), si se tienen en cuenta los requisitos microbiológicos establecidos por la norma mexicana que establece un límite de mesófilos de 1x10⁴ ufc/g.

Sin embargo, la vida útil de los productos almacenados en dichas condiciones se limitó por los cambios sensoriales. Los ensayos sensoriales de aceptabilidad mostraron que los consumidores presentaron un cambio en su actitud hedónica, volviéndose la misma negativa hacia bizcochuelos almacenados en ATM por 15 días, mientras que el mismo cambio en la aceptabilidad se vio en bizcochuelos envasados en AIRE a 4°C por 22 días. Estos resultados son concordantes con los cambios en la frecuencia de uso de los términos para describir a los bizcochuelo en la pregunta CATA. El producto fue percibido inicialmente, en ambos casos, como dulce, húmedo, blando, esponjoso, liviano y suave. A los 15 y a los 22 días los bizcochuelos envasados en ATM y en AIRE respectivamente fueron descritos principalmente utilizando

términos como duro, se desmiga, sabor extraño, seco. Este cambio en la elección de los términos indicaría cambios sensoriales perceptibles en los productos caracterizados por un aumento de la percepción de sequedad y la disminución de la sensación de humedad, lo que explicaría el cambio en la actitud hedónica de los consumidores.

El almacenamiento de los bizcochuelos, en ambas condiciones de envasado, modificó las propiedades sensoriales del producto. Dichos cambios fueron percibidos por el consumidor y ocasionaron un cambio en su respuesta hedónica. Los cambios sensoriales fueron percibidos primero en bizcochuelos envasados en ATM N₂:CO₂ 50:50 (almacenamiento 25°C) que en bizcochuelos envasados en AIRE (almacenamiento 4°C). Estos cambios se relacionaron con la pérdida de humedad del producto, ya que con el avance de los días de almacenamiento el producto se volvió más seco. La pérdida de humedad podría deberse a una baja humedad relativa dentro del envase. Al realizar el envasado de los bizcochuelos se realiza una primera etapa de vacío parcial, para luego inyectar el gas de interés. En esta etapa podría eliminarse el vapor de agua, por lo cual podría considerarse en ensayos futuros alguna estrategia para mantener la humedad dentro del envase. Teniendo en consideración que esta modificación podría generar cambios en la actividad de agua del producto se deberían realizar nuevos ensayos para validar el envasado en ATM N₂:CO₂ 50:50 como única estrategia para impedir el biodeterioro.

7- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El método de conservación de bizcochuelos en aire a 25°C no asegura una vida útil mayor a 4 días en las condiciones de producción ensayadas, debido a la aparición de biodeterioro fúngico. El agregado de sorbato de potasio en la concentración máxima autorizada por el Reglamento Bromatológico Nacional, no resultaría efectivo en inhibir el biodeterioro y por lo tanto no sería útil su incorporación a la premezcla de preparación.

Las estrategias de envasado en ATM y almacenado a 25°C, y envasado en AIRE y almacenado a 4°C, podrían utilizarse para inhibir el deterioro fúngico de bizcochuelos, prolongando el almacenamiento por 21 días. Sin embargo, dado que la vida útil de los bizcochuelos en ambos casos se vio limitada por los cambios sensoriales relacionados con la pérdida de humedad del producto, las estrategias utilizadas deberían combinarse con un método de conservación de humedad dentro del envase. Esta modificación podría generar cambios en la actividad de agua del bizcochuelo, por lo cual deberían realizarse nuevos ensayos para validar el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

Abellana M, Torres, L., Sanchis, V., Ramos, A.J. (1997) Caracterización de diferentes productos de bollería industrial: II. Estudio de la micoflora. *Alimentaria* **287**: 51-56.

Air-Liquide (2011) Productos y Servicios: Gases. www.uy.airliquide.com Uruguay. Consultada en agosto 2015.

Ares G & Jaeger SR (2015) 11 - Check-all-that-apply (CATA) questions with consumers in practice: experimental considerations and impact on outcome. *Rapid Sensory Profiling Techniques*. Delarue J, Lawlor JB & Rogeaux M (eds.), pp. 227-245. Woodhead Publishing.

Ares G & Jaeger SR (2015) Examination of sensory product characterization bias when check-all-that-apply (CATA) questions are used concurrently with hedonic assessments. *Food Quality and Preference* **40, Part A**: 199-208.

Ares G, Parentelli C, Gámbaro A, Lareo C & Lema P (2006) Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology* **41**: 191-197.

Ares G, Barreiro C, Deliza R, Giménez A & Gámbaro A (2010) Application of a Check-All-That-Apply question to the development of chocolate milk desserts. *Journal of Sensory Studies* **25**: 67-86.

Ares G, Reis F, Oliveira D, *et al.* (2015) Recommendations for use of balanced presentation order of terms in CATA questions. *Food Quality and Preference* **46**: 137-141.

Arquiza JMRA & Hunter J (2014) The use of real-time PCR to study *Penicillium chrysogenum* growth kinetics on solid food at different water activities. *International Journal of Food Microbiology* **187**: 50-56.

Berk Z (2013) Chapter 16 - Spoilage and Preservation of Foods. *Food Process Engineering and Technology (Second Edition)*. Berk Z (ed.), pp. 395-398. Academic Press, San Diego, USA.

Berry M, Fletcher J, McClure P & Wilkinson J (2008) Effects of Freezing on Nutritional and Microbiological Properties of Foods. *Frozen Food Science and Technology*. Evans J.A (ed.), pp. 26-50. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Bishop JR & White CH (1986) Assessment of Dairy Product Quality and Potential Shelf-Life - A Review. *Journal of Food Protection* **49**: 739-753.

Branquinho MR, Ferreira RTB & Cardarelli-Leite P (2012) Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **32**: 112-118.

- Bruzzone F, Ares G & Giménez A (2012) Consumers' texture perception of milk desserts. II- Comparison with trained assessors' data. *Journal of Texture Studies* **43**: 214-226.
- Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J & Gruden K (2006) Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* **6**: 37.
- Cardelli C & Labuza TP (2001) Application of Weibull hazard analysis to the determination of the shelf life of roasted and ground coffee. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **34**: 273-278.
- Carter AT & Peck MW (2015) Genomes, neurotoxins and biology of Clostridium botulinum Group I and Group II. *Research in Microbiology* **166**: 303-317.
- CAST CfASaT (2003) Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. *Council of Agricultural Science and Technology (CAST) Task Force Report No. 139*: 13-35.
- Çelik İ, Yılmaz Y, Işık F & Üstün Ö (2007) Effect of soapwort extract on physical and sensory properties of sponge cakes and rheological properties of sponge cake batters. *Food Chemistry* **101**: 907-911.
- Chaven S (2014) Honey, Confectionery and Bakery Products. *Food Safety Management*. Lelieveld YM (ed.), pp. 283-299. Academic Press, San Diego, USA.
- CRL-GMFF (2008) Report on the Validation of a DNA Extraction Method from Maize Seeds and Grains. *Community Reference Laboratory for GM Food and Feed* European Commission.
- Cruz RS, Camilloto GP & Pires ACdS (2012) Oxygen Scavengers: An Approach on Food Preservation. *Structure and Function of Food Engineering*. Ayman AE (ed.), pp. 21-42. InTech.
- Dagnas S & Membré J-M (2013) Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. *Journal of Food Protection* **76**: 538-551.
- Dagnas S, Onno B & Membré JM (2014) Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. *International Journal of Food Microbiology* **186**: 95-104.
- de JONG SN, Levesque CA, Verkley GJM, Abeln ECA, Rahe JE & Braun PG (2001) Phylogenetic relationships among Neofabraea species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the b-tubulin gene. *Mycological Research* **105**: 658-669.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & C.W. R (2008) *InfoStat, versión 2008* Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. .

- Dodds KL (1989) Combined effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked, vacuum-packed potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 656-660.
- Dorak MT (2007) *Real-time PCR*. Taylor & Francis Group, Oxford, UK.
- El-Banna AA & Leistner L (1988) Production of penitrem A by *Penicillium crustosum* isolated from foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology* **7**: 9-17.
- Fernández V (2011) Water Activity. *Encyclopedia of Astrobiology*. Gargaud M, Amils R, Quintanilla J, Cleaves H, II, Irvine W, Pinti D & Viso M (eds.), pp. 1763-1764. Springer, Heidelberg, Alemania.
- Filténborg O, Frisvad JC & Svendsen JA (1983) Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 581-585.
- Forsythe SJ & Hayes PR (2000) Food spoilage. *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. Forsythe SJ & Hayes PR (eds.), pp. 86-149. Springer, USA.
- Frisvad J, Thrane U, Samson R & Pitt J (2006) Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Food Mycology*, Vol. 571. Hocking AD, Pitt JI, Samson R & Thrane U (eds.), pp. 3-31. Springer, USA.
- Frisvad JC & Samson RA (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology* **49**: 1-174.
- Gámbaro A, Ares G & Giménez A (2006) Shelf-life estimation of apple-baby food. *Journal of Sensory Studies* **21**: 101-111.
- Geisen R (2015) *Penicillium* Mycotoxins: Physiological and Molecular Aspects. *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. Paterson RRM & Lima N (eds.), pp. 423. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Gil-Serna J, González-Salgado A, González-Jaén MT, Vázquez C & Patiño B (2009) ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **131**: 162-167.
- Giménez A, Varela P, Salvador A, Ares G, Fiszman S & Garitta L (2007) Shelf life estimation of brown pan bread: A consumer approach. *Food Quality and Preference* **18**: 196-204.

Giménez A, Ares F & Ares G (2012) Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Food Research International* **49**: 311-325.

Giménez A, Gagliardi A & Ares G (2015) Influence of evoked contexts on consumers' rejection of two products: Implications for shelf life estimation. *Food Research International* **76, Part 3**: 527-531.

Guynot ME, Marín S, Sanchis V & Ramos AJ (2003) Modified Atmosphere Packaging for Prevention of Mold Spoilage of Bakery Products with Different pH and Water Activity Levels. *Journal of Food Protection* **66**: 1864-1872.

Guynot ME, Marín S, Sanchis V & Ramos AJ (2004) An attempt to minimize potassium sorbate concentration in sponge cakes by modified atmosphere packaging combination to prevent fungal spoilage. *Food Microbiology* **21**: 449-457.

Guynot ME, Marín S, Sanchis V & Ramos AJ (2005) An attempt to optimize potassium sorbate use to preserve low pH (4.5-5.5) intermediate moisture bakery products by modelling Eurotium spp., Aspergillus spp. and Penicillium corylophilum growth. *International Journal of Food Microbiology* **101**: 169-177.

Hasan S & Abdolgader R (2012) Study of Weak Acid Preservatives and Modified Atmosphere Packaging (MAP) on Mold Growth in Modal Agar System. *Food and Nutrition Sciences* **3**: 802-809.

Haugland RA, Varma M, Wymer LJ & Vesper SJ (2004) Quantitative PCR Analysis of Selected Aspergillus, Penicillium and Paecilomyces Species. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 198-210.

Hidalgo PI, Ullán RV, Albillos SM, *et al.* (2014) Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in Penicillium roqueforti and Penicillium chrysogenum: Cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genetics and Biology* **62**: 11-24.

Houbraken J & Samson RA (2011) Phylogeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology* **70**: 1-51.

Hough G (2010) *Sensory shelf life estimation of food products*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Hough G, Langohr K, Gómez G & Curia A (2003) Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Foods. *Journal of Food Science* **68**: 359-362.

- ICMSF (1986) Part II. Specific Proposal for Sampling and Sampling Plans. *Microorganisms in Foods: Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*, pp. 127-278. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- ICMSF (1996) Toxigenic Fungi: Penicillium. *Microorganisms in Foods: Characteristics of Food Pathogens*, Vol. 5, pp. 397-413. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- IFST (1993) *Shelf life of foods: Guidelines for its determination and prediction*. London: Institute of Food Science and Technology.
- 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* **2015**: 1-8.
- Kokkonen M, Jestoi M & Rizzo A (2005) The effect of substrate on mycotoxin production of selected Penicillium strains. *International Journal of Food Microbiology* **99**: 207-214.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* **27**: 95-125.
- Lahlali R, Serrhini MN, Friel D & Jijakli MH (2006) In vitro effects of water activity, temperature and solutes on the growth rate of *P. italicum* Wehmer and *P. digitatum* Sacc. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 628-636.
- Lawless HT & Heymann H (2010). *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices (Second Edition)*. Springer, New York, USA.
- Le Dréan G, Mounier J, Vasseur V, Arzur D, Habrylo O & Barbier G (2010) Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology* **138**: 100-107.
- Lebail A & Goff HD (2009) Freezing of Bakery and Dessert Products. *Frozen Food Science and Technology*, ed. ^eds.), p. ^pp. 184-204.
- Legan JD (1993) Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation* **32**: 33-53.
- Lewis PR, Donoghue MB, Hocking AD, Cook L & LV. G (2005) Tremor syndrome associated with a fungal toxin: sequelae of food contamination. *Med J Aust.* **182**: 582-584.
- Lezcano EP (2011) Análisis de producto: Productos batidos. www.alimentosargentinos.gob.ar Argentina. Consultada en setiembre 2015.

Manzocco L & Lagazio C (2009) Coffee brew shelf life modelling by integration of acceptability and quality data. *Food Quality and Preference* **20**: 24-29.

Marín S, Ramos AJ & Sanchis V (2005) Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology* **99**: 329-341.

Marín S, Guynot ME, Sanchis V & J Ramos A (2003) Hydrolytic enzyme activities as indicators of fungal spoilage in bakery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 685-691.

Marín S, Guynot ME, Sanchis V, Arbonés J & Ramos AJ (2002) *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, and *Penicillium corylophilum* spoilage prevention of bakery products by means of weak-acid preservatives. *Journal of Food Science* **67**: 2271-2277.

Meziani S, Kaci M, Jacquot M, *et al.* (2012) Effect of freezing treatments and yeast amount on sensory and physical properties of sweet bakery products. *Journal of Food Engineering* **111**: 336-342.

Naudé TW, O'Brien OM, Rundberget T, McGregor AD, Roux C & Flaoyen A (2002) Tremorgenic neuromycotoxicosis in 2 dogs ascribed to the ingestion of penitrem A and possibly roquefortine in rice contaminated with *Penicillium crustosum*. *J S Afr Vet Assoc.* **73**: 211-215.

Ndagijimana M, Chaves-López C, Corsetti A, *et al.* (2008) Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* **127**: 276-283.

Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. *Diario Oficial de la Federación*. www.dof.gob.mx México D.F., México. Consultada en setiembre 2015.

NTS N° -MINS/DIGESA-V.01 "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano" *Ministerio de Salud del Perú*. www.minsa.gob.pe Lima, Perú. Consultada en setiembre 2015.

Ozdemir M & Floros JD (2004) Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**: 185-193.

P.Saranraj & M.Geetha (2012) Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* **3**: 38-48.

- Parry RT (1993) Introduction. *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*. Parry RT (ed.) pp. 1-18. Springer, USA.
- Penta Cake. Cake Recipes. www.long-life-cakes Zarzir, Israel. Consultada en setiembre 2015.
- Pitt J & Hocking A a (2009) Spoilage of Stored, Processed and Preserved Foods. *Fungi and Food Spoilage (Third Edition)*, pp. 401-421. Springer, New York, USA.
- Pitt J & Hocking A b (2009) Penicillium and Related Genera. *Fungi and Food Spoilage (Third Edition)*, pp. 169-273. Springer, New York, USA.
- Pitt J & Hocking A c (2009) The Ecology of Fungal Food Spoilage. *Fungi and Food Spoilage (Third Edition)*, pp. 3-9. Springer, New York, USA.
- Pitt JI (1975) Xerophilic fungi and the spoilage of food of plant origin. *Water Relations of Foods*. Duckworth RB (ed.) pp. 273. Academic Press, London, UK.
- Porep JU, Walter R, Kortekamp A & Carle R (2014) Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food Control* **37**: 77-84.
- Rahman M (2015) Hurdle Technology in Food Preservation. *Minimally Processed Foods*. Siddiqui MW & Rahman MS (eds.), pp. 17-33. Springer International Publishing.
- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA & Frisvad JC (2011) Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology* **115**: 406-420.
- RBN (1994) *Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N°315/994. (Tercera edición)*. Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales (IMPO). Uruguay.
- Real Decreto. R. D. 2419/78, B.O.E 19/5/78; derogado por R.D. 135/2010, BOE 25/02/2010. *Boletín Oficial del Estado*. www.boe.es Madrid, España. Consultada en setiembre 2015.
- Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AFA, Houbraken JAMP & Frisvad JC (2004) Phylogenetic analysis of Penicillium subgenus Penicillium using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology* **49**: 175-200.
- Seiler DAL (1998) Bakery products. *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*. (Blakistone BA, (ed.), pp. 135-157. Blackie Academic and Professional, Bishopbriggs, Glasgow, UK.
- Shah M & Pathak K (2010) Development and Statistical Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Simvastatin by Using 2(3) Full-Factorial Design. *AAPS PharmSciTech* **11**: 489-496.

- Shweta S, Madhavan S, Paranidharan V & Velazhahan R (2013) Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays. *International Food Research Journal* **20**: 3329-3335.
- Smith JP, Daifas DP, El-Khoury W, Koukoutsis J & El-Khoury A (2004) Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**: 19-55.
- Smyth JD, Don AD, Christian LM & Stern MJ (2006) Comparing Check-All and Forced-Choice Question Formats in Web Surveys. *The Public Opinion Quarterly* **70**: 66-77.
- Sonjak S, Frisvad JC & Gunde-Cimerman N (2005) Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS Microbiology Ecology* **53**: 51-60.
- Stratford M, Plumridge A, Nebe-von-Caron G & Archer DB (2009) Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International Journal of Food Microbiology* **136**: 37-43.
- Suanthie Y, Cousin MA & Woloshuk CP (2009) Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research* **45**: 139-145.
- Suhr KI & Nielsen PV (2004) Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology* **95**: 67-78.
- Suhr KI & Nielsen PV (2005) Inhibition of Fungal Growth on Wheat and Rye Bread by Modified Atmosphere Packaging and Active Packaging Using Volatile Mustard Essential Oil. *Journal of Food Science* **70**: M37-M44.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K & Bigger SW (2003) Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Journal of Food Science* **68**: 408-420.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Taniwaki M, Pitt J, Hocking A & Fleet G (2006) Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Advances in Food Mycology*, Vol. 571. Hocking AD, Pitt JI, Samson R & Thrane U (eds.), pp. 49-67. Springer, USA.

- Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI & Fleet GH (2009) Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* **132**: 100-108.
- Tannous J, Atoui A, El Khoury A, *et al.* (2015) Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. *Food Microbiology* **50**: 28-37.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, *et al.* (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* **78**: 343-371.
- Weidenbörner M (2001) I. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*, pp. 119-120. Springer, Heidelberg, Alemania.
- Wheeler KA, Hurdman BF & Pitt JI (1991) Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* **12**: 141-149.
- Wigmann TF, Saccomori F, Bernardi AO, Frisvad JC & Copetti MV (2015) Toxigenic penicillia spoiling frozen chicken nuggets. *Food Research International* **67**: 219-222.
- Wilderjans E, Luyts A, Brijs K & Delcour JA (2013) Ingredient functionality in batter type cake making. *Trends in Food Science & Technology* **30**: 6-15.
- Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC & Samson RA (2014) Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology* **78**: 175-341.

ANEXOS

Anexo 1- Protocolo 1 de extracción de ADN

- a. Agregar 500 μ L de buffer de lisis al micelio molido bajo nitrógeno líquido. Vortexear.
- b. Incubar 1 hora a 65°C
- c. Agregar 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1)
- d. Centrifugar 10 min a 10000 rpm y a 4°C
- e. Separar sobrenadante a un nuevo eppendorf 1.5 mL estéril (aprox. 300 μ L)
- f. Agregar 150 μ L de NaCl 1 M y 150 μ L de H₂O destilada estéril. Vortexear
- g. Precipitar con un volumen de isopropanol frío (aprox. 600 μ L). Invertir el tubo suavemente 2 o 3 veces. Incubar a -20°C toda la noche
- h. Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Descartar sobrenadante
- i. Agregar 100 μ L de EtOH 70%
- j. Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Descartar sobrenadante
- k. Secar el pellet el tiempo necesario (30'-1h) a temperatura ambiente o en estufa a 35°C
- l. Resuspender en 30 μ L de agua MiliQ

Anexo 2- Protocolo 2 de extracción de ADN

*Protocolo adaptado de “Maize Seeds Sampling and DNA Extraction – Report on the Validation of a DNA Extraction Method from Maize Seeds and Grains” del “Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, 2008” (CRL-GMFF, 2008).

- a. Colocar 200 μ L de la suspensión de bizcochuelo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL
- b. Agregar 700 μ L de buffer CTAB y 10 μ L de solución ARNasa 10 mg/mL
- c. Incubar a 65°C durante 30 minutos
- d. Agregar 10 μ L de Proteinasa K 20 mg/mL
- e. Incubar a 65°C durante 30 minutos
- f. Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos.
- g. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL conteniendo 500 μ L de cloroformo.
Mezclar por inversión.
- h. Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos
- i. Transferir la fase acuosa superior a un tubo de 2.0 mL
- j. Agregar dos volúmenes de solución de precipitación CTAB.
- k. Incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- l. Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante.
- m. Disolver el precipitado en 350 μ L NaCl 1.2 M
- n. Agregar 350 μ L cloroformo y mezclar por inversión.
- o. Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos.
- p. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 mL
- q. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión. Incubar durante toda la noche a -20°C.
- r. Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
- s. Agregar 500 μ L de EtOH 70%. Mezclar.

- t. Centrifugar 10 minutos a 12000 g
- u. Secar en estufa a 45°C
- v. Resuspender en 100 µL de agua MiliQ estéril.
- w. Se conserva a -20°C hasta su utilización.

Anexo3- Boleta de evaluación sensorial

Progress...

Muestra: 578

¿Cuánto le gusta este bizcochuelo para consumirlo en la situación que se le planteó al comienzo del estudio?

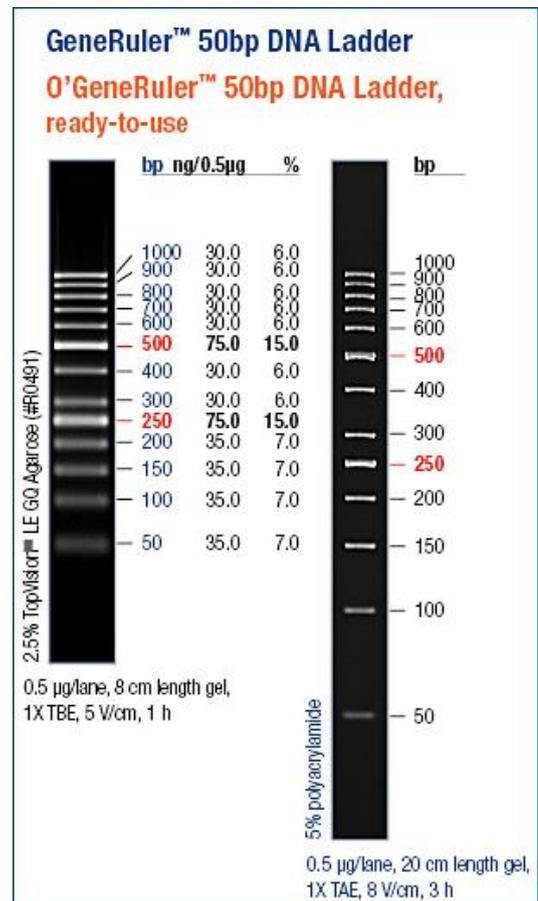
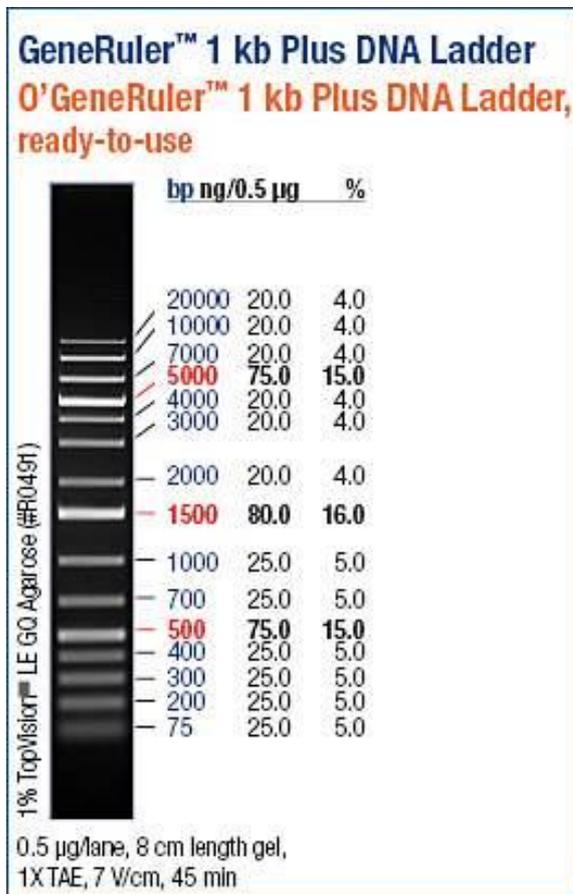
Me disgusta mucho		Ni me gusta ni me disgusta		Me gusta mucho
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

¿Compraría este bizcochuelo para la situación que se le planteó al comienzo del estudio?

Marque todas las palabras que considere adecuadas para describir este bizcochuelo, considerando la situación que se le planteó al comienzo del estudio:

<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Suave"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Aireada"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Liviana"/>
<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Se desmiga"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Esponjosa"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Sabor extraño"/>
<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Blanda"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Seca"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Húmeda"/>
<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Sabor a naranja"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Dura"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Sabor a limón"/>
<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Sabor a vainilla"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Desabrido"/>	<input type="checkbox"/> <input type="text" value="Dulce"/>

Anexo 4- Marcadores de peso molecular utilizados



Anexo 5- Buffers y soluciones

Buffer de Lisis

Pesar:

1.2 g de Tris

4 mL 0.5 M EDTA pH 8.0

1.5 g NaCl

2 g SDS

H₂O.....c.s.p. 100 mL

Autoclavar

Buffer CTAB

Mezclar:

10 mL 1M Tris-HCL pH 8.4

8.18 g NaCl

5 mL 0.5 M EDTA pH 8.0

2.0 g CTAB

H₂O.....c.s.p. 100 mL

Autoclavar

Solución de precipitación con CTAB

Pesar:

1.0 g CTAB

0.5 g NaCl

Agregar 100 mL de H₂O destilada

Ajustar a pH 8.0 con NaOH 1 M

Completar el volumen hasta 200 mL

Autoclavar

Anexo 6- Medios de cultivo

Medio Czapek yeast extract agar (CYA)

K_2HPO_41 g
 Concentrado Czapek.....10 mL
 Solución de metales traza.....1 mL
 Extracto de levadura en polvo.....5 g
 Sacarosa.....30 g
 Agar.....15 g
 Agua destilada.....1 L
 pH final 6.7
 Autoclavar

Concentrado Czapek

$NaNO_3$30 g
 KCl5 g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$5 g
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$0.1 g
 Agua destilada.....100 mL
 No se autoclava

Solución de metales traza

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$0.5 g
 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$1 g
 Agua destilada.....100 mL
 No se autoclava

Yeast Nitrogen Base Glucose Agar (YNBGA)

YNB.....6.7 g
 Glucosa.....10 g
 Agar.....15 g
 Agua destilada.....1 L
 Autoclavar

Yeast Extract Sucrose (YES)

Extracto de Levadura.....150 g
 Sacarosa.....20 g
 Agua destilada.....1 L
 Autoclavar

