



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Determinación de los parámetros de tiempo y temperatura óptimos para un proceso de pasteurización que asegure la estabilidad microbiológica de una bebida carbonatada, no alcohólica a base de malta

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Samuel Chirinos como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor (a): Lic. Laura de Oliveira

Asesor académico: Msc. Carolina Palomino

CARACAS, VENEZUELA

MAYO – 2017

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL

Br. Samuel Chirinos

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de el Br. Samuel Alejandro Chirinos Romero, C.I.: 20.051.496 titulado "Determinación de los parámetros de tiempo y temperatura óptimos para un proceso de pasteurización que asegure la estabilidad microbiológica de una bebida carbonatada, no alcohólica a base de malta" para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**, con una calificación de 20 puntos.

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas, a los 18 días del mes de mayo de 2017.



Laura DeOliveira

Tutor



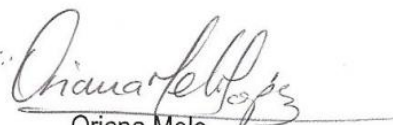
Carolina Palomino

Asesor académico



Raúl Martínez

Jurado



Oriana Melo

Jurado

En memoria de:

Omaira Soledad Chirinos.

Cuya admiración por mi humildad y perseverancia fue un motor para finalizar esta travesía. Que en paz descanse...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano cuyo sacrificio y paciencia significaron siempre una inspiración que llenaba de estamina mi ser cuando la fatiga calaba hondo en mis aspiraciones; quienes fungieron además, como un férreo soporte que permitió el alcance de éste efímero, pero importante triunfo que hoy celebramos. No es mi éxito es de ustedes.

A mi novia, Neskaryl, cuya paciencia e incondicional apoyo fue un ariete que abrió camino cuando mis temores e inseguridades me cegaban y paralizaban en los momentos de mayor apremio.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Investigación y Soporte Científico de Empresas Polar, en especial a mi tutora Laura De Oliveira quien además de una amiga, fue una gran guía para llevar a buen destino este trabajo. Cabe mencionar también a Edelmira Peña, Adriana Bravo y Yamila Fuentes quienes fueron un apoyo durante mi estancia en la empresa. Gracias a todas por colaborar con mi crecimiento personal y profesional.

A mis profesores que mantuvieron latente la semilla del investigador en mi y la bañaron de conocimiento a lo largo del proceso de convertirme en licenciado, en especial a la profesora Carolina Palomino cuyo apoyo fue de especial ayuda en esta última etapa de mi carrera; y a la profesora Guillermina Alonso, quien más que una profesora fue una ayuda incondicional no solo en lo académico sino en labores mas allá de su responsabilidad, que no dudo en realizar, sin esperar nada a cambio, más que su afán de formar otro profesional para ésta República.

A todos aquellos que aportaron un granito de arena para que festeje hoy en día...

RESUMEN

Las bebidas carbonatadas no alcohólicas a base de malta representan en general un ambiente que permite el crecimiento de algunos microorganismos, pero limita la sobrevivencia de muchos otros. Parámetros como la presencia de dióxido de carbono (CO₂), el pH, la presencia de azúcares son factores a tener en cuenta a la hora de evaluar posibles contaminantes. La fisiología de las levaduras, los esporulados y las bacterias ácido lácticas las hace potenciales de riesgo para este tipo de bebidas.

Tomando en cuenta las características de una bebida carbonatada no alcohólica a base de malta se seleccionó un conjunto de microorganismo cuyas propiedades fisiológicas permiten en principio su contaminación y prevalencia en la matriz. Con los microorganismos que lograron adaptarse a la bebida, se evaluó su resistencia en el tiempo a diferentes niveles de inóculo; seleccionándose aquellos que mostraron crecimiento a niveles que implican daño en las propiedades sensoriales de la bebida.

Seguido a esto se evaluó su resistencia a diferentes temperaturas y se calcularon parámetros cinéticos que llevaron a la formulación de un tratamiento de pasteurización que mantuviera la estabilidad microbiológica del producto sin afectar su calidad organoléptica, encontrándose que un tratamiento de 62°C durante 12 minutos, es suficiente para asegurar la calidad e inocuidad de la bebida.

Palabras clave: pasteurización, inocuidad, levaduras, esporulados, BAL, patógenos, resistencia, adaptación, parámetros cinéticos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1	Bebidas ácidas carbonatadas	3
2.1.1	Definición	3
2.1.2	Componentes	3
2.1.2.1	Agua	3
2.1.2.2	Edulcorantes	3
2.1.2.3	Dióxido de carbono	4
2.1.2.4	Acidificantes	4
2.1.2.5	Saborizantes	5
2.1.2.6	Colorantes	5
2.1.2.7	Conservantes	5
2.2	Producción de bebidas a base de malta	6
2.3	Tecnología de Pasteurización	7
2.4	Tecnología de barreras	11
2.4.1	Parámetros intrínsecos	12
2.4.1.1	pH	12
2.4.1.2	Contenido humedad/actividad del agua	14
2.4.1.3	Potencial oxidación-reducción (OR/Eh)	15
2.4.1.4	Contenido nutrientes	15
2.4.1.5	Constituyentes antimicrobianos	16
2.4.1.6	Adaptación microbiana y resistencia al estrés	17

2.4.2	Parámetros extrínsecos _____	17
2.4.2.1	Temperatura de almacenamiento _____	17
2.4.2.2	Humedad relativa del ambiente _____	18
2.4.2.3	Presencia y concentración de gases en el ambiente _____	18
2.4.2.4	Presencia y actividad de otros microorganismos _____	19
2.5	Evaluación de la resistencia térmica _____	19
2.5.1	Factores que afectan resistencia térmica de microorganismos _____	19
2.5.1.1	Factores físico-químicos del medio de crecimiento _____	19
2.5.1.1.1	pH del medio _____	19
2.5.1.1.2	Concentración de Sales _____	20
2.5.1.1.3	Actividad del agua (a_w) _____	20
2.5.1.1.4	Carbohidratos, lípidos y proteínas _____	20
2.5.1.2	Factores inherentes a los microorganismos _____	21
2.5.2	Métodos para evaluar resistencia térmica de microorganismos _____	22
2.5.2.1	Método del tubo _____	22
2.5.2.2	Método de la lata _____	22
2.5.2.3	Método del tanque _____	23
2.5.2.4	Método del frasco _____	24
2.5.2.5	Método del tubo capilar _____	24
2.5.2.6	Método del termoresistómetro _____	24
2.5.2.7	Método del tubo no sellado _____	25
2.5.2.8	Método de la jeringa _____	25
2.5.3	Parámetros para evaluar resistencia térmica de microorganismo _____	26

2.5.3.1	Valor D	26
2.4.1.2	Valor Z	27
2.5	Microorganismos riesgo: contaminantes frecuentes aislados de proceso y potenciales de riesgo	28
2.5.1	Bacterias ácido lácticas (BAL)	28
2.5.2	Levaduras	30
2.5.3	Bacterias formadoras de esporas	31
3.	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo principal	32
3.2	Objetivos específicos	32
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1	Reactivos y soluciones	33
4.2	Materiales y Equipos	34
4.3	Microorganismos a estudiar	36
4.3.1	Levaduras	36
4.3.2	Bacterias ácido lácticas	36
4.3.3	Esporulados	36
4.3.4	Patógenos	37
4.4	Metodología	37
4.4.1	Adaptación de microorganismos de cepario a la matriz de la bebida	37
4.4.2	Pruebas de identificación bioquímica	38
4.4.2.1	Tinción Gram	38
4.4.2.2	Prueba de la catalasa	39

4.4.2.3	Prueba de la Oxidasa	39
4.4.3	Retos microbianos	39
4.4.4	Ensayos de resistencia térmica	42
4.4.5	Cálculos de valores D, F y Z	43
4.4.6	Pruebas a nivel de laboratorio de condiciones de tiempo y temperatura propuestas	44
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
5.1	Adaptación de microorganismos de cepario a la matriz de la bebida	46
5.2	Retos microbianos	55
5.3	Ensayos de resistencia térmica	75
5.4	Cálculo de parámetros cinéticos	92
5.5	Pruebas a nivel de laboratorio de condiciones de tiempo y temperatura propuestas	99
6.	CONCLUSIONES	102
7.	RECOMENDACIONES	104
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9.	ANEXOS	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de temperatura en un tratamiento de pasteurización en un pasteurizador tipo túnel. Tomado y modificado de Mendieta y colaboradores (2012).....	10
Figura 2. Intercambiador de calor de placas. Tomado y modificado de Fellow (2000).....	10
Figura 3. Rangos de pH aproximados de microorganismos contaminantes de alimentos y bebidas. Tomado y modificado de Jay (2005).....	13
Figura 4. Esporas de cepas F.S.7 calentadas en guisantes. 4A) Curva de muerte térmica; 4B) curva de tiempo de muerte térmica (Jay, 2005).....	28
Figura 5. Adaptación de microorganismos de cepario a la bebida no alcohólica carbonatada a base de malta.....	47
Figura 6. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1 cél/mL.....	56
Figura 7. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,01 cél/mL.....	57
Figura 8. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 10 cél/mL.....	58
Figura 9. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 100 cél/mL.....	58
Figura 10: Uso de diferentes azúcares por las levaduras.....	62
Figura 11. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1 cél/mL.....	67
Figura 12. Comportamiento de los <i>Clostridium</i> en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1000 cél/mL.....	72
Figura 13. Resistencia de <i>Sacharomyces pastorianus</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	77
Figura 14. Resistencia de <i>Rhodotorula rubra</i> aislada, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	78
Figura 15. Resistencia de <i>Lactobacillus paracasei</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	85

Figura 16. Resistencia de <i>Lactobacillus brevis</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	85
Figura 17. Resistencia de <i>Clostridium butyricum</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	87
Figura 18. Resistencia de <i>Clostridium acetobutylicum</i> , sometidas a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	88
Figura 19. Resistencia de <i>Clostridium bifermentans</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	89
Figura 20. Curva de sobrevivencia térmica de <i>Rhodotorula rubra</i> aislada, se muestran las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada tratamiento.....	95
Figura 21. Curva de sobrevivencia térmica de <i>Pichia anomala</i> , se muestran las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada tratamiento.....	96
Figura 22. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,1 cél/mL.....	119
Figura 23. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,1 cél/mL.....	119
Figura 24. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,01 cél/mL.....	120
Figura 25. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 10 cél/mL.....	120
Figura 26. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 100 cél/mL.....	121
Figura 27. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1000 cél/mL.....	121
Figura 28. Resistencia de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	122
Figura 29. Resistencia de <i>Pichia anomala</i> , sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios sólidos y líquidos usados para cada grupo de microorganismos, a lo largo de toda la investigación.....	37
Tabla 2. Volúmenes usados durante la adaptación de microorganismos de cepario a la malta.....	38
Tabla 3. Número de unidades logarítmicas (UL) máximas reducidas para cada tratamiento térmico y su correspondiente tiempo de tratamiento usado, para cada uno de los microorganismos en el estudio.....	76
Tabla 4. Valores de tiempo de reducción decimal de los microorganismos más termorresistentes para cada temperatura evaluada.....	94
Tabla 5. Valores F obtenidos para los microorganismos más termorresistentes.....	99
Tabla 6. Tratamientos equivalentes postulados a partir de los valores Z para cada microorganismo.....	100
Tabla 7. Tratamiento de pasteurización, inóculo de 2UL.....	101
Tabla 8. Tratamiento de pasteurización, inóculo de 6 UL.....	102

1. INTRODUCCIÓN

Las bebidas a base de malta se definen como el producto no alcohólico obtenido de las sustancias solubles de la cebada malteada, adicionado o no de otros cereales, lúpulo, aromatizantes, saborizantes y edulcorantes; carbonatado, filtrado, envasado y pasteurizado (COVENIN, 2002).

Estas bebidas contienen una alta cantidad de azúcares fácilmente asimilables por diversos microorganismos por lo que representa un sustrato idóneo para el crecimiento de una amplia gama de éstos. Si bien otros parámetros como el pH y la carbonatación, que genera un ambiente anaeróbico, pueden en principio generar una barrera de crecimiento, algunos microorganismos tienen una fisiología y una capacidad de adaptación biológica que les permite crecer en la bebida (Juvonen, 2011).

Las levaduras, están especialmente adaptadas para sobrevivir en una medio con las características de las bebidas a base de malta, su capacidad para utilizar diferentes azúcares como fuentes de energía y multiplicarse en un ambiente ácido, así como un metabolismo fermentativo que las dota de una enorme capacidad para vivir en un ambiente anaeróbico, las hace de especial cuidado en la industria de las bebidas carbonatadas no alcohólicas. El daño por levaduras involucra turbidez, olores y sabores desagradables, además la producción de dióxido de carbono (CO₂) por éstas, puede llevar al hinchamiento e incluso la explosión del empaque (Juvonen, 2011).

Adicionalmente, las bacterias ácido lácticas son contaminantes frecuentes en matrices de este tipo, ya que, su metabolismo fermentativo les permite como a las levaduras crecer en ambientes anaeróbicos y resistir además hostiles componentes como lo puede ser el etanol (producto fermentativo). Ambientes con bajo pH, bajo contenido de oxígeno y bajas temperaturas son susceptibles al daño por este tipo de microorganismos (Blackburn, 2006).

Por otro lado, los esporulados están comúnmente asociados al daño en alimentos que se ven sometidos a tratamientos térmicos como la pasteurización (Blackburn, 2006). El pH de la bebida representa una potencial barrera de protección contra este tipo de microorganismos, pero; dicho grupo desarrolló en el tiempo la propiedad de formar una estructura de resistencia, la endospora, dicho mecanismo les permite sobrevivir largos tiempos en ambientes hostiles como lo puede ser un pH lejano del rango de crecimiento, radiación uv, limitación de nutrientes, altas y bajas temperaturas entre otros (Tortora, 2004). Tras verse inmersos en un ambiente con idóneas características para su crecimiento se estimula el proceso de germinación con lo que inicia su multiplicación y es aquí donde está su potencial riesgo. Debido a esto la contaminación con esta clase de microorganismo es bastante frecuente (Juvonen, 2011).

Debido a que las bebidas a base de malta son susceptibles a la contaminación microbiológica, son generalmente sometidos a procesos de pasteurización, tratamiento térmico suave que involucra un proceso de calentamiento en búsqueda de mantener la inocuidad del producto (Stumbo, 1973). El efecto destructivo de las altas temperaturas sobre los microorganismos es aprovechado en este proceso, lo que mantiene bajo control la presencia de microorganismos en las bebidas a base de malta. Se emplean temperaturas y tiempos de contacto relativamente bajos pero que aseguran la prolongación de la vida útil del alimento sin variar las propiedades organolépticas del producto (Jay, 2005).

Tomando en cuenta los aspectos fisiológicos de contaminantes frecuentes aislados durante el proceso de producción de la malta, así como de aquellos que pudiesen representar potenciales contaminantes, se llevará a cabo un estudio que permita definir un proceso de pasteurización manteniendo la inocuidad y la calidad del producto sin comprometer las propiedades organolépticas del mismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bebidas ácidas carbonatadas

2.1.1 Definición

Las bebidas gaseosas o carbonatadas son “productos obtenidos por disolución del anhídrido carbónico en agua potable, agregado o no de: edulcorantes, jugos de frutas, concentrados de frutas, sustancias aromáticas y aditivos legalmente permitidos” (COVENIN, 1995).

2.1.2 Componentes

Los componentes de este tipo de bebidas comprenden:

2.1.2.1 Agua

Principal ingrediente, usualmente contribuye con el 85 al 95% del producto y actúa como portador de los demás ingredientes. Debe cumplir con rígidos requisitos de calidad para lo cual es tratada tanto química como microbiológicamente, para que de esta manera no interfiera con el sabor, apariencia, carbonatación y demás propiedades del producto final (Steen y Ashurst, 2006).

2.1.2.2 Edulcorantes

Los edulcorantes son sustancias utilizadas para aumentar el sabor dulce de un alimento o bebida en particular, estos pueden clasificarse como intrínsecos, que corresponde a aquellos que forman parte natural del alimento; y extrínsecos o añadidos que se limitan a aquellos azúcares y jarabes añadidos a alimentos o bebidas durante su preparación (Cummings y Stephen, 2007). En las bebidas ácidas carbonatadas la cantidad oscila entre 5-14%. Sacarosa, glucosa y fructosa son los más empleados (Juvonen y col, 2011).

Además de estos edulcorantes añadidos, durante el proceso de elaboración de algunas bebidas es común encontrar carbohidratos propios de la producción de la misma. En el caso de las bebidas a base de malta, durante el proceso del malteo en la producción del mosto se producen amplias cantidades de azúcares principalmente representados por la maltosa (Briggs y col, 2004). El principal carbohidrato presente en los granos de cebada es el almidón, presente bajo la forma de amilosa y amilopectina; por otro lado, las enzimas más importantes durante el malteo son las amilasas α y β que degradan estos compuestos, los productos de la primera corresponden a dextrinas ramificadas y lineales; mientras que la segunda genera fundamentalmente maltosa, importante en las bebidas a base de malta ya que esta molécula es la principal responsable del sabor dulce del extracto de malta. En la industria cervecera representa un azúcar fácilmente fermentable (Hough, 1990).

2.1.2.3 Dióxido de carbono

Gas incoloro e inodoro que aporta el burbujeo propio de las bebidas gaseosas, este gas se añade al final del proceso, previo al sellado del envase. La solubilidad del CO_2 disminuye con el aumento de la temperatura (Juvonen y col, 2011). Es por esto que se recomienda consumir estas bebidas frías para mantener así la carbonatación en el producto y así su particular y refrescante sabor; así como en algunos casos mantener la estabilidad microbiológica (Steen y Ashurst, 2006).

2.1.2.4 Acidificantes

Proporciona el sabor levemente ácido a las bebidas gaseosas por lo que son una parte importante en el producto final. Debido a la disminución del pH consecuencia de la adición de éstos, se dota a la bebida de un medio poco propicio al crecimiento bacteriano; funcionando así como un potencial

conservante. Los más utilizados son el ácido tartárico, ácido cítrico y ácido fosfórico. (Steen y Ashurst, 2006).

2.1.2.5 Saborizantes

Se obtienen de fuentes naturales o artificiales y proporcionan el sabor característico de cada una de las variedades presentes en el mercado, otorgando además al producto final de un particular y característico sabor que atrae al consumidor (Steen y Ashurst, 2006).

2.1.2.6 Colorantes

La percepción del color influye en la recepción por parte de un consumidor de una determinada bebida, por lo que el uso de estos aditivos está altamente distendido en la industria alimenticia, a pesar de no proveer ningún valor nutritivo. El color complementa un sabor en particular, por ejemplo; los colores naranja y amarillo evocan sabores ácidos, los rojos sabores más dulces; azules y verdes bebidas más refrescantes (sabores a menta); el marrón como el refresco de cola sabores más pesados; así se percibe una relación color-sabor que lleva a la escogencia de una bebida en particular, así como un mayor disfrute de la misma (Steen y Ashurst, 2006).

2.1.2.7 Conservantes

Son sustancias capaces de inhibir, retardar o detener el crecimiento de microorganismos que conlleva al deterioro del alimento; entre los más usados se encuentran los ácidos benzoico y sorbico (Steen y Ashurst, 2006).

2.2 Producción de bebidas a base de malta

La malta, que entra en la clasificación de bebidas gaseosa, es el producto no alcohólico obtenido de sustancias solubles de la cebada malteada, adicionado o no de otros cereales, lúpulo, aromatizantes y edulcorantes; carbonatado, filtrado, envasado y pasteurizado (COVENIN, 2002).

La producción de bebidas a base de malta involucra un proceso de germinación controlada de la cebada seguido de la aplicación de calor para detener el proceso. En una primera etapa se estimula la germinación de los granos de cebada para lo que se requieren condiciones de temperatura y humedad controladas además de la presencia de oxígeno; durante la germinación el embrión pasa de un estado latente a una forma metabólicamente activa induciendo entonces la actividad de enzimas que difunde por todo el endospermo y desdoblan el almidón, proteínas, grasas, entre otros componentes. Seguido al proceso de germinación se lleva a cabo el tostado, proceso en el que se aumentan las temperaturas con el objetivo de disminuir la humedad en los mismos y con esto cese la acción de las enzimas. Finalmente, la malta se almacena a temperatura ambiente durante 4 a 6 semanas, para asegurar que no continúen las reacciones en el interior de grano, lo cual reduciría la calidad de la malta al utilizar. (Brigs, 2004).

En la producción de la bebida, el producto antes obtenido se mezcla con agua y algún otro componente de acuerdo a lo que se desee lograr; posterior a esto se calienta hasta conseguir la sacarificación del almidón, una vez alcanzado esto último se obtienen en la mezcla una pasta sólida (bagazo) y un componente líquido (mosto). El mosto, se separa de la parte sólida mediante filtración; otros componentes como lúpulo y edulcorantes, además de dióxido de carbono son añadidos para obtener las bebidas a base de malta (Hough, 1990).

2.3 Tecnología de Pasteurización

La pasteurización es un proceso mediante el cual se reducen poblaciones de microorganismos mediante el uso de altas temperaturas, con el fin de permitir la conservación de un producto durante un tiempo limitado (Madigan y col, 2003). Este proceso mantiene la estabilidad biológica del producto y extiende su tiempo de almacenamiento por medio de la reducción de la carga microbiana, sin alterar las propiedades sensoriales del mismo. Así, la pasteurización se diferencia de la esterilización en que este último es un tratamiento térmico muy intenso, mientras la pasteurización es suave y no elimina todos los microorganismos presentes en el alimento (Madigan y col, 2003).

En alimentos de baja acidez ($\text{pH} > 4,5$) es usado para minimizar los daños de organismos patogénicos y extender el vencimiento del alimento por varios días. En alimentos con alta acidez ($\text{pH} < 4,5$) el tratamiento térmico puede ser más suave, debido al efecto que tiene la alta acidez en los microorganismos permitiendo el crecimiento solo de acidófilos; así, el vencimiento del alimento puede extenderse hasta por varios meses (Fellows, 2000).

El calor genera ruptura de los enlaces que mantienen las uniones peptídicas lo que conlleva a la desnaturalización de proteínas y eventualmente al deceso de microorganismos. (Mathews y col, 2002). Esto es aprovechado en la industria alimentaria y sanitaria que utilizan el calor húmedo como medio de esterilización total y comercial (Fellows, 2000).

La esterilidad comercial se define como la “condición lograda por la aplicación de calor o por el control de la actividad de agua y aplicación de calor, que hace al alimento libre de formas viables de microorganismos significativos desde el punto de vista de salud pública, así como de cualquier otro no patógeno, pero sí capaz de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales no refrigeradas, de almacenamiento y distribución” (Covenin, 1985). Así, un producto comercialmente

estéril puede contener microorganismos viables siempre que estos no sean patógenos, no se multipliquen, ni tampoco generen cambios en las propiedades organolépticas del producto. Es esta la condición que se busca alcanzar en productos alimenticios comerciales usando este proceso como método de inocuidad.

Cuando los microorganismos y/o las esporas son sometidos a un proceso de calentamiento como la pasteurización, no todos mueren al mismo tiempo, sino que una proporción es destruida en un período de tiempo dado mientras el resto sobrevive. Si a los sobrevivientes se les somete a un proceso similar (igual tiempo y temperatura), morirá la misma proporción de microorganismos. Así, un tratamiento térmico dado siempre elimina la misma proporción microbiana con respecto al inóculo inicial para cada etapa, con lo cual la cinética de la muerte térmica, en condiciones isotérmicas, es de primer orden (Stumbo, 1973).

Matemáticamente el efecto de la pasteurización viene dado por:

$$\text{Ecuación 1: } t = D \times \log \frac{N_0}{N}$$

Dónde:

N= n° microorganismos sobrevivientes

No= n° microorganismos antes del tratamiento

D= valor D

t= tiempo de calentamiento a una temperatura dada

La combinación de tiempo y temperatura es crucial debido a que determina la intensidad del tratamiento térmico; mientras más alta sea la temperatura usada, menor será el tiempo necesario

para alcanzar la esterilización comercial. Sin embargo, el uso de altas temperaturas pone en riesgo la calidad organoléptica del producto por lo que los valores de tiempo y temperatura deben escogerse en función de éstos (Tortora y col, 1992).

Existen distintos tipos de pasteurización, clasificados de acuerdo al tiempo y el grado de calentamiento usado:

LTLT (baja temperatura largo tiempo), es un método que consiste en el calentamiento a 63°C (145°F) por 30 minutos. Otro método más ampliamente utilizado es el de HTST (alta temperatura corto tiempo), el cual consiste en el calentamiento a 72°C (161°F) por 15 segundos; este método también es conocido como pasteurización flash y es menos destructivo que el método expuesto previamente. El tratamiento UHT (ultra high temperature) es otro tratamiento térmico que destruye patógenos no formadores de esporas, además de reducir considerablemente poblaciones de esporulados. Este tratamiento es alcanzado con tratamientos a temperaturas de 135-140°C (275-284°F) por unos pocos segundos (tratamiento mínimo es 54°C por 1 segundo) (Jay, 2005).

La pasteurización puede realizarse industrialmente en equipos de grandes dimensiones llamados pasteurizadores tipo túnel, en estos, las botellas pasan a través de un túnel o cámara de rociado de agua, cuya temperatura va aumentando a medida que la botella avanza a través del equipo, hasta alcanzar en la mitad del proceso la temperatura deseada (Figura 1). Posterior a esto, comienza la etapa de enfriamiento donde se baja la temperatura rociando agua hasta aproximadamente 25°C. (Mendieta y col, 2012).

Otro tipo de pasteurizador ampliamente utilizado, es el intercambiador de calor de placas que consiste en una serie de placas de acero inoxidable conectadas una seguida de la otra (Figura 2);

cada placa está equipada con una junta de goma sintética para producir un sello hermético y para evitar la mezcla del producto y los medios calentamiento (Fellows, 2000).

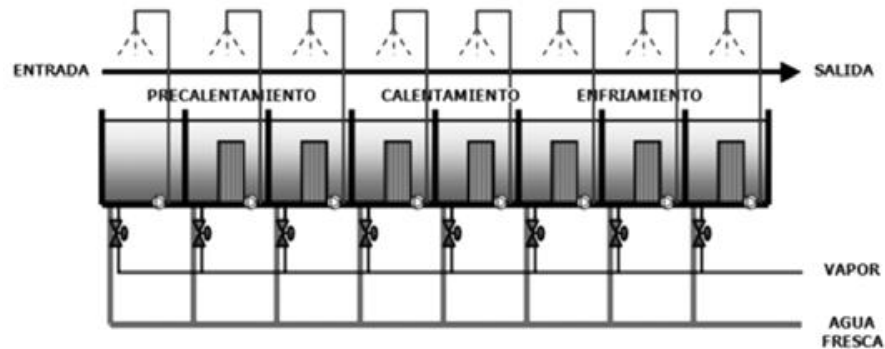


Figura 1. Fases de temperatura en un tratamiento de pasteurización en un pasteurizador tipo túnel. Tomado y modificado de Mendieta y colaboradores (2012).

En operación el alimento es bombeado desde un tanque balanceado a una sección de regeneración, donde el alimento es precalentado por producto ya pasteurizado. Luego en la sección de calentamiento, es elevada la temperatura hasta la de pasteurización por el tiempo necesario; transcurrido éste, el producto es enfriado en la sección de regeneración (a medida que se precaliente el siguiente producto a pasteurizar) y es finalmente enfriado con agua (Fellows, 2000).



Figura 2. Intercambiador de calor de placas. Tomado y modificado de Fellow (2000).

El nivel de pasteurización se mide a través del cálculo de las unidades de pasteurización, la cual físicamente representa la acción letal a 60°C durante 1 minuto, sobre los microorganismos presentes en el producto durante el proceso (Patiño & col, 2001) Matemáticamente se representa como:

$$\text{Ecuación 2: } UP = t \times 1,393^{Tb-60}$$

Donde:

T= equivale al tiempo de exposición del producto en el proceso

Tb= corresponde con la temperatura (°C) en el centro geométrico del envase del producto.

2.4 Tecnología de barreras

El deterioro de alimentos es causado por solo una pequeña cantidad de los microorganismos presentes inicialmente, así un tipo específico de daño puede surgir en un determinado alimento bajo condiciones normales de almacenamiento. Este tipo específico de daño vendrá determinado por el alimento en cuestión y los microorganismos contaminantes, surgiendo así una asociación de cada grupo de microorganismo con un tipo de alimento en particular (Mossel e Ingram, 1955).

Factores denominados intrínsecos y extrínsecos influyen la estabilidad microbiológica en alimentos y bebidas. (Mossel e Ingram, 1955). Los primeros, se asocian con la formulación de la bebida e incluyen la acidez, la carbonatación, nutrientes y antimicrobianos presentes en el sistema. Los parámetros extrínsecos por su parte, no son dependientes de la características de la bebida o el alimento en cuestión, sino que se relacionan con las propiedades de almacenamiento del producto (Sperber y Doyle, 2009).

Juntos estos parámetros representan una primera y natural barrera de protección contra la contaminación microbiana y posterior daño en productos alimenticios. Teniendo en cuenta estos

parámetros se puede predecir los potenciales contaminantes de un alimento en específico y en consecuencia determinar la estabilidad general del mismo (Jay, 2005).

2.4.1 Parámetros intrínsecos

2.4.1.1 pH

Acidez y pH son los más importantes obstáculos que deben sortear los microorganismos para su prevalencia en un producto en particular (Mentz y col, 2010). La mayoría de los microorganismos presentan un óptimo crecimiento con valores de pH cercanos a 7 (6.6-7.5), muy pocos logran crecer por debajo de 4 (Jay, 2005) La figura 3 muestra los rangos aproximados de pH en los que crecen algunos microorganismos contaminantes de alimentos.

Las bacterias por lo general presentan rangos de pH más estrechos que mohos y levaduras. El pH mínimo y máximo señalado en la figura 3 no debe interpretarse como límites, pues éste no es el único factor de crecimiento. El pH bajo por sí solo no garantiza la seguridad y la estabilidad del producto, así el pH mínimo para el crecimiento y la tasa de inactivación dependen de la naturaleza del acidulante, la presencia de otros inhibidores y los mecanismos de resistencia de ácido de un organismo (Juvonen, 2011).

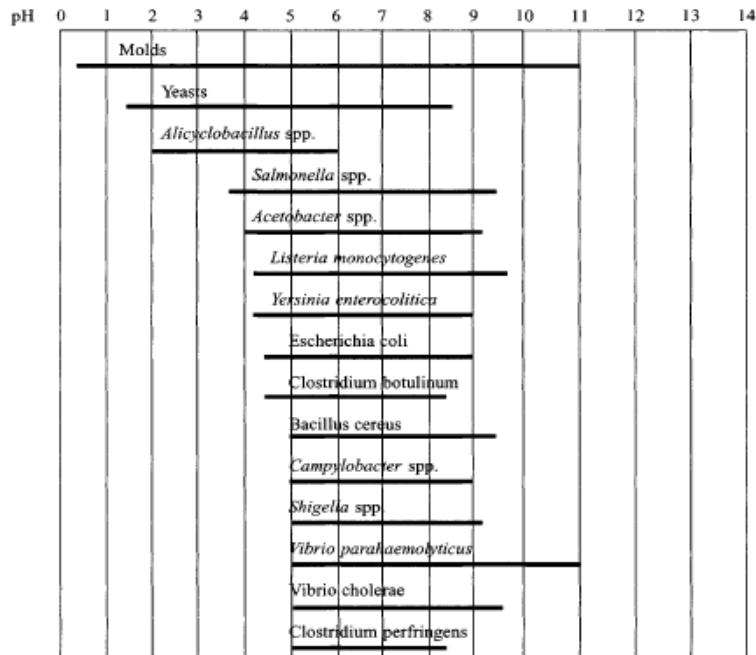


Figura 3. Rangos de pH aproximados de microorganismos contaminantes de alimentos y bebidas. Tomado y modificado de Jay (2005).

Por ejemplo, el pH mínimo de crecimiento de algunos lactobacilos depende del tipo de ácido usado, con ácido cítrico, fosfórico y tartárico, se permite el crecimiento a valores más bajos de pH que con ácido láctico o acético (Jay, 2005). Otro ejemplo, en presencia de 0.2 M NaCl, *Alcaligenes faecalis* mostró un rango de pH de crecimiento más amplio, que en ausencia de NaCl o que en la presencia de 0.2 M de citrato de sodio (Sherman y Holm, 1902).

La estabilidad microbiológica de productos como frutas, bebidas ácidas carbonatadas o no carbonatadas, vinagre, vinos, entre otros, se debe en parte al disminuido pH que poseen (alejado del óptimo de crecimiento bacteriano), manteniendo a raya el crecimiento de bacterias contaminantes. Contrario a esto, es muy común observar daño por mohos y levaduras en este tipo de alimento y es debido precisamente a que estos microorganismos pueden crecer a valores de pH por debajo de 3.5; pH característicos de estos (Jay, 2005).

2.4.1.2 Contenido humedad/actividad del agua

Uno de los principales métodos de conservación de alimentos es la desecación, la cual es una consecuencia directa de la remoción de la humedad, sin la cual los microorganismos no pueden sobrevivir. Los requerimientos de agua de los microorganismos son descritos bajo el término de actividad del agua (a_w) (Jay, 2005). El efecto general de la disminución de la a_w es alargar la duración de la fase de latencia de crecimiento y disminuir la tasa de crecimiento de la población final (Scott, 1957). El efecto de la ausencia de agua está en la inhibición de las funciones metabólicas, esto debido a que todas las reacciones químicas de las células requieren un ambiente acuoso (Tortora y col, 1992).

Todos los microorganismos presentan valores límites de a_w debajo de los cuales no pueden crecer, formar esporas o producir metabolitos tóxicos (Beauchat, 1983). En general las bacterias requieren valores mayores de a_w para su crecimiento, que mohos y levaduras; teniendo las bacterias gram negativas requerimientos más altos que las gram positivas. Muchas bacterias no crecen por debajo de valores de a_w de 0.91 y los mohos se limitan a valores por debajo de 0.80 (Zeuthen y Bogh-Sorensen, 2003). El valor más bajo de a_w reportado para bacterias contaminantes de alimentos es 0.75 para bacterias halófilas; mientras que mohos xerofílicos y levaduras osmófilas tienen valores de crecimiento de a_w de 0.65 y 0.61 (Zeuthen y Bogh-Sorensen, 2003).

El efecto de la a_w está influenciado por parámetros como el pH, temperatura de crecimiento, entre otros. Estudiando el efecto de la a_w en el crecimiento de *Enterobacter aerogenes* se encontró que la fase de latencia y tiempo generacional fue progresivamente alargada hasta no producirse crecimiento, con la disminución de la actividad del agua. El valor mínimo de a_w fue aumentado cuando se redujo la temperatura de incubación. Cuando tanto el pH como la temperatura de

incubación eran desfavorables, la a_w mínima para el crecimiento se hizo mayor (Wodzinski y Frazier, 1961).

2.4.1.3 Potencial oxidación-reducción (OR/Eh)

El potencial OR de un sustrato puede ser definido como la facilidad con la que este gana o pierde electrones. Cuando los electrones son transferidos de un compuesto a otro, se crea una diferencia de potencial, la cual puede ser medida y es expresada en milivoltios (mV). Mientras más oxidado está una sustancia más positivo será su potencial, mientras más reducido más negativo. Los microorganismos aeróbicos requieren valores positivos de Eh (oxidado) para crecer, mientras los anaeróbicos requieren valores negativos de éste (reducido) (Jay, 2005).

2.4.1.4 Contenido nutrientes

Los nutrientes necesarios para crecimiento de microorganismos incluyen, una fuente de carbono y nitrógeno, vitaminas, factores de crecimiento y minerales. El agua aunque no se considera un nutriente es esencial para que se lleven a cabo todas las reacciones químicas necesarias para la síntesis celular y producción de energía. (Ray, 1996). Los mohos tienen los requerimientos más bajos, seguidos por las bacterias gram negativas, levaduras y bacterias gram positivas. (Jay, 2005).

Para producción de energía los microorganismos pueden usar distintas fuentes, como azúcares, alcoholes, aminoácidos. Algunos pueden usar carbohidratos complejos como almidón y celulosa degradándolos primero a azúcares simples. Las grasas pueden ser usadas también como fuentes de energía pero son muy pocos los que tienen la maquinaria necesaria para utilizarlos (Tortora y col, 1992). Todos los microorganismos que normalmente se encuentran en alimentos metabolizan glucosa, la utilización de otros carbohidratos difiere enormemente. Esto debido a la habilidad que

pueden o no presentar algunos para transportar monosacáridos y disacáridos; así como hidrolizar polisacáridos (Ray, 1996). La adición de edulcorantes como sacarosa incrementa la probabilidad de daño en el producto, en especial por levaduras, se encontró incluso una relación directa entre la concentración de azúcares fermentables y la susceptibilidad al daño en el producto; así, el uso de endulzantes artificiales tiende a reducir la sensibilidad de la bebida al daño (Juvonen y col, 2011).

Las principales fuentes de nitrógeno usadas son los aminoácidos, algunos pueden usar nucleótidos y aminoácidos libres, otros péptidos y proteínas. En general las bebidas ácidas, son muy pobres en nitrógeno, por lo que este es otro parámetro que influye en el crecimiento de contaminantes, sin embargo las levaduras pueden crecer con bajos niveles de nitrógeno (0.2–0.5 mg/L) (Juvonen y col, 2011).

Microorganismos pueden requerir vitamina B en bajas cantidades, y casi todos los alimentos naturales tienen una abundante cantidad de éste para aquellos microorganismos que no puede sintetizarlo. En general, gram positivas son las que menos sintetizan compuesto por lo que es necesaria su suplementación para su crecimiento. Las gram negativas y mohos pueden sintetizar muchos o todos los componentes que requieren; así, estos dos últimos se pueden encontrar en alimentos que presenten bajo contenido de vitamina B (Jay, 2005).

2.4.1.5 Constituyentes antimicrobianos

La estabilidad microbiológica de algunos alimentos es debido a ciertos componentes que están presentes naturalmente en estos, y que poseen actividad antimicrobiana. Un ejemplo de esto está en la leche de vaca, que presenta una sustancia que inhibe microorganismos hasta concentración de 10^6 UFC/mL. Este componente es destruido con la pasteurización. La caseína de la leche y algunos

ácidos grasos también han mostrado tener un efecto antimicrobiano bajo ciertas condiciones (Bjorck, 1978).

2.4.1.6 Adaptación microbiana y resistencia al estrés

Muchas condiciones que los microbios se enfrentan en la producción de bebidas representan estrés para las células. Una respuesta adaptativa al estrés puede producirse, lo que puede proporcionar protección contra tensiones letales posteriores de la misma o diferente especie (Chung y col, 2006; Van de Guchte y col, 2002).

2.4.2 Parámetros extrínsecos

Estos parámetros no dependen del sustrato o del alimento en cuestión, sino más bien están relacionados con las propiedades de almacenamiento que afectan tanto al alimento como a los microorganismos (Mossel e Ingram, 1955). Los de mayor relevancia en cuanto a microorganismos dañinos de alimentos comprenden:

2.4.2.1 Temperatura de almacenamiento

Microorganismos tienen amplios rangos de temperatura, esto es un factor a tener en cuenta al momento de establecer la temperatura de almacenamiento de un determinado alimento (Ray, 1996).

Las temperaturas más bajas en las que se ha reportado crecimiento microbiano es de - 34°C y la más alta supera los 100°C (Jay, 2005). Organismos que crecen bien a 7°C y tienen un óptimo entre 20 y 30°C se conocen como psicrótrofos; aquellos que crecen bien entre 20 y 45°C con un óptimo entre 30-40°C son referidos como termófilos (Talaro y Chase, 2015). Las bacterias psicrotrofas más comúnmente encontradas en alimentos son los pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* y *Enterococcus*, estos crecen muy bien a temperaturas de refrigeración (5-7°C), causando daños en

alimentos refrigerados a estas temperaturas. Los mesófilos en general no crecen a temperaturas de refrigeración, pero si a temperaturas por encima de estas, óptimas para su crecimiento, ejemplos de estos son *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Shewanella*, entre otros (Jay, 2005).

Aunque en principio pareciera deseable almacenar cualquier alimento a temperatura de refrigeración, esto no es siempre lo mejor para la estabilidad microbiológica del producto, por ejemplo los cambures se almacenan mejor a temperaturas ente 13-17°C que a temperaturas de 5-7°C (Jay, 2005).

2.4.2.2 Humedad relativa del ambiente

La humedad relativa del ambiente de almacenamiento influye directamente en la actividad del agua presente en el alimento y de esta forma compromete la sensibilidad al daño. Cuando se asienta la a_w a 0.60 es importante que el alimento sea almacenado bajo condiciones que no permitan una toma de humedad del aire que lleve a un incremento de la a_w a un punto que permita la presencia de microorganismos. Alimentos con baja a_w colocados en ambientes con alta humedad relativa tienden a tomar humedad del ambiente en el que se encuentran hasta establecerse un equilibrio; alimentos con alta a_w en ambientes con baja humedad relativa tienden a perder humedad hasta establecerse un equilibrio. Cortes de carne u otro alimento indebidamente envuelto y almacenado bajo refrigeración, propicia el deterioro del mismo debido a la alta humedad relativa en el congelador (Jay, 2005).

2.4.2.3 Presencia y concentración de gases en el ambiente

El dióxido de carbono es el gas atmosférico más importante usado para el control microbiológico (Jay, 2005). Las bebidas carbonatadas en general son menos propensas al daño microbiológico que

las bebidas no carbonatadas, esto debido a que la carbonatación puede inhabilitar el crecimiento de microorganismos dañinos mediante la inhibición de la división celular, la disminución de la absorción de aminoácidos, perturbación del buffer citoplasmático, reduce el pH citoplasmático, además de promover la esporulación. A pesar de este efecto, muchas levaduras son resistentes a los grados de carbonatación de este tipo de bebidas, encontrándose las más resistentes en los grupos *Dekkera* y *Saccharomyces* (Querol y Fleet, 2006).

Muchos microorganismos contaminantes de alimentos necesitan de oxígeno para su sobrevivencia por lo que en este tipo de matrices donde los niveles de oxígeno son muy bajos, ven muy disminuida su posibilidad de prevalencia; siendo este un factor importante en la estabilidad microbiológica de un alimento o bebida en particular (Madigan y col, 2003).

2.4.2.4 Presencia y actividad de otros microorganismos

Algunos microorganismo producen sustancias que genera un daño e incluso son potencialmente letales para otros, esto incluye antibióticos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos (Jay, 2005).

2.5 Evaluación de la resistencia térmica

2.5.1 Factores que afectan resistencia térmica de microorganismos

2.5.1.1 Factores físico-químicos del medio de crecimiento

2.5.1.1.1 pH del medio

En general los microorganismos son más resistentes al calor en un pH de crecimiento cercano a 7, a medida que éste aumente o disminuye la sensibilidad al calor será mayor. Esta condición presenta una ventaja a la hora de aplicar tratamientos de esterilización, pues en alimentos con alta acidez la

temperatura necesaria para alcanzar la esterilidad será menor, con respecto a alimentos que presenten un pH cercano a la neutralidad (Jay, 2005). Por ejemplo para esporas de *Bacillus cereus* se tiene que a pH: 6,5; 5,5; 4,5; se obtuvieron respectivamente valores de resistencia D mayores, a pH más cercano a la neutralidad: 2.39; 1.04; 0.51; al someterlos a una temperatura de 95°C (Gaillard y col, 1998).

2.5.1.1.2 Concentración de Sales

El efecto de las sales varía dependiendo del tipo de sal y la concentración de ésta. En algunos casos tiene un efecto protector, se cree porque disminuye la actividad del agua, lo que acarrea en un aumento de la resistencia térmica de los microorganismos; otras sales (ejemplo Ca^{+2} y Mg^{+2}) tienden a disminuir la actividad del agua, lo que conlleva a una disminución en la termoresistencia (Jay, 2005).

2.5.1.1.3 Actividad del agua (a_w)

La resistencia al calor de las células microbianas aumenta con la disminución en la cantidad del agua, se reportó por ejemplo que para esporas de *Bacillus cereus*: una a_w de 1 y pH=6,5 el valor D_{95} = 2,386 minutos; para una a_w de 0,86 a idéntico pH, el valor D obtenido fue de 13,842 minutos (Gaillard y col, 1998).

2.5.1.1.4 Carbohidratos, lípidos y proteínas

La presencia de azúcares en los medios de suspensión aumenta la resistencia de los microorganismos presentes en ella, esto en parte debido a la disminución de la a_w consecuencia del aumento de la concentración en el medio por la presencia de los carbohidratos. Los lípidos presentes en alimentos ejercen un efecto de “blindaje” sobre los microorganismos, esto debido

quizás al aislamiento del agua generado por las características hidrofóbicas de los lípidos presentes en las capas que rodean las células (Strumbo, 1973). Las proteínas presentes en alimentos o en el medio de calentamiento, se piensa ejercen también un “efecto protector” sobre los microorganismos; se cree, debido al aumento de la estabilidad de las proteínas de membrana mediante interacciones electrostáticas con aminoácidos o diferentes proteínas. (Jay, 2005).

2.5.1.2 Factores inherentes a los microorganismos

La resistencia térmica de los microorganismos varía al pasar de una etapa de crecimiento a otra, en general las células de la fase estacionaria son las que poseen mayor termorresistencia, pero esto varía con la especie (Stumbo, 1973). Se han encontrado casos en los que las células son más resistentes en la fase lag o de latencia, y más sensibles al calor en la fase logarítmica. (Ng y col, 1969).

Los organismos termófilos son los que presentan mayor resistencia a las altas temperaturas, pues su óptimo de crecimiento ronda los 50 y 60°C, con un mínimo de 45°C y un máximo de 70°C e incluso con valores por encima de éste. Así, los organismos termófilos están ya adaptados a las altas temperaturas por lo que son menos susceptibles a tratamientos térmicos, estos microorganismos presentan enzimas termoestables, presumiblemente por la mayor presencia de aminoácidos hidrofóbicos en comparación a las enzimas similares presentes en los mesófilos (Jay, 2005).

A mayor número de microorganismos (densidad celular), mayor será la resistencia al calor. Se sugiere que el mecanismo que lleva al aumento en la resistencia térmica es debido a la producción de sustancias protectoras excretadas por las células. Otra explicación es que en una población celular densa, la probabilidad de encontrar organismos termoresistentes es mucho mayor que en

poblaciones más pequeñas. Se ha demostrado que ciertas especies microbianas aumentan su resistencia térmica al crecer en presencia de otras especies (O'Connor-Cox en Ramirez, 1999).

2.5.2 Métodos para evaluar resistencia térmica de microorganismos

Los métodos más usados para estimar la resistencia térmica de microorganismos comprenden:

2.5.2.1 Método del tubo

Conocido también como el método del “tubo único”, este procedimiento consiste en calentar determinadas cantidades de una suspensión de microorganismos o esporas en pequeños tubos de vidrio (7-10 mm de diámetro) de capacidad entre 1 y 4 mL. Después de cerrarlos bajo la llama, los tubos se introducen en un baño de aceite mineral o vegetal, propilenglicol o algún otro medio adecuado, a temperatura constante; y a intervalos de tiempos determinados el tubo se saca y es enfriado en agua rápidamente. Posterior a esto, se procesa el contenido de los tubos cultivando el mismo en un medio apropiado y se determina la presencia o ausencia de crecimiento microbiano (Bigelow y Esty 1920).

La simplicidad y fácil realización de este método en cualquier laboratorio representa su mayor ventaja. El llenado, sellado, calentamiento y subcultivo de los tubos consume tiempo, lo que representa su principal desventaja; además, el calentamiento no es instantáneo, y por otro lado, durante el subcultivo existe la posibilidad de que se queden algunos sobrevivientes en el tubo (Stumbo, 1973).

2.5.2.2 Método de la lata

Se emplean latas de dimensiones de 6,35 cm de diámetro por 0,95 cm de alto que contienen entre 13 y 16 mL de medio inoculado. Las latas cerradas se someten a altas temperaturas en pequeños

autoclaves conectados a un tanque de vapor, el sistema esta acoplado a una red de agua para el posterior enfriamiento en los mismos autoclaves; se alcanzan temperaturas entre 100 y 140°C. La incubación puede ser directa o abrir la lata y subcultivar el contenido (Townsend y col 1938). Una de las ventajas de este método es la posibilidad de trabajar con un gran número de réplicas de manera simultánea, además el uso de latas genera mayor facilidad a la hora de subcultivar, puesto que la dinámica en el proceso (abrir las latas) es más fácil que por ejemplo en el uso de capilares. La desventaja es la necesidad de equipos especiales para llevar a cabo este proceso (Stumbo, 1973).

2.5.2.3 Método del tanque

Un equipo permite calentar bajo presión y al mismo tiempo añadir el inóculo y tomar muestras sin variar las condiciones bajo las cuales se realiza el ensayo. El sistema es básicamente un pequeño autoclave, provisto de un propulsor para agitar la suspensión, y de válvulas especiales para retirar las muestras. El equipo consta de un pequeño depósito cilíndrico de acero inoxidable con dimensiones de 10 cm de diámetro y 11 cm de profundidad, tiene una capacidad de 900 mL y está equipado con un termómetro y un agitador. En el fondo del tanque se encuentran 4 válvulas conectadas cada una a un tubo de ensayo para la recogida de muestras. (Williams y Robertson, 1954).

El inóculo frío se coloca en el tanque y comienza a calentarse uniformemente con la agitación; al alcanzar la temperatura provista se toman las muestras en tubos de ensayo. La ventaja del método está en que se pueden utilizar medios inoculados tanto líquidos como líquidos con sólidos, además es fácil obtener las muestras para el recuento de supervivientes (Stumbo, 1973).

Los tiempos necesarios para elevar la temperatura hasta la requerida son altos, debido al gran volumen de muestra, lo que limita el empleo de este método a temperaturas por debajo de 115°C;

además de esta desventaja, la construcción del tanque es complejo y su manejo requiere gran precisión (Stumbo, 1973).

2.5.2.4 Método del frasco

Diseñado para el estudio de resistencia térmica en organismos no esporulados y formadores de esporas de baja resistencia térmica; se realiza a temperaturas inferiores al punto de ebullición del agua, limitante que representa su principal desventaja. En el proceso se usan por lo general recipientes de tres bocas (tubo Woulf), como el usado por Levine en 1927, por dos de ellas se introducen un agitador y un termómetro, dejando así la tercera boca para añadir el inóculo y tomar muestras a los diferentes intervalos de tiempo para posterior subcultivo. La principal ventaja de este procedimiento está en que requiere equipos relativamente sencillos, que pueden encontrarse en cualquier laboratorio (Stumbo, 1973).

2.5.2.5 Método del tubo capilar

Diseñado por Stern y Proctor en 1954 utiliza tubos de vidrio de 0,8 mm de diámetro y 1,5 mm de altura los cuales son cerrados, manteniendo dentro la suspensión de medio con los microorganismos. Los capilares son colocados luego en una bandeja directamente en un baño de agua caliente; luego de cierto tiempo, la bandeja que soporta los capilares es colocada en agua fría para su enfriamiento. Este método permite el calentamiento y enfriamiento casi instantáneo de los tubos y la incubación se lleva a cabo posterior al enfriamiento. La desventaja de este método es el tedioso trabajo que representan las labores de llenado y sellado de los tubos, así como de introducir las muestras en los mismos. (Stumbo, 1973).

2.5.2.6 Método del termoresistómetro

En 1948 Stumbo y col, diseñaron un termoresistometro que permitía realizar estudios en un intervalo de temperaturas de entre 115,6 y 132 °C. Este sistema consistía en tres cámaras conectadas a un depósito de vapor de tal forma que cada una podía llenarse o vaciarse de forma independiente. Una vez inoculadas las muestras se colocan en pequeñas placas metálicas colocadas en moldes de aluminio, que pasan a través de las tres cámaras del sistema, esterilizadas previamente. En la primera cámara, se cargan las cápsulas, se aplica la temperatura de prueba, en la segunda y en la tercera se enfrían mediante evaporación y son trasladadas a los tubos que contienen el medio de cultivo. La principal ventaja del método corresponde a un calentamiento y enfriamiento rápido de las muestras; su principal detrimento está en que limita al estudio a temperaturas por encima de los 100°C (215°F); además del uso de un equipamiento especial (Stumbo, 1973).

2.5.2.7 Método del tubo no sellado

Ideado por Schmidt en 1950, consiste en calentar la suspensión en pequeños tubos con un tapón de algodón, esto permite la adición directa del inóculo a los tubos de cultivo una vez que comienza el calentamiento. Su ventaja está en que se elimina la apertura y sellado de tubos, lo que hace el procedimiento más sencillo; mas su desventaja está en el difícil control de la temperatura debido a que corrientes de aire pueden suponer un enfriamiento del tubo.

2.5.2.8 Método de la jeringa

Propuesto por Kooiman y Geers en 1974, en este procedimiento se usan tubos o frascos con tapas de roscas provistas de un tampón de neopreno a través del cual se inyecta un inóculo luego de que la temperatura del medio de prueba es equilibrada en un baño termostático. Al realizar el inóculo, 0,1 mL de la suspensión de esporas o microorganismos es añadida a 10 mL del medio, mediante el uso de una jeringa. Una vez aplicada la temperatura por el intervalo de tiempo establecido, los tubos se

colocan en un baño de agua-hielo y luego se cultiva cada muestra en el medio apropiado. Este método tiene la ventaja que permite trabajar a temperaturas cercanas a los 100 °C, sin experimentar los fenómenos de evaporación del medio de prueba que se observan cuando se trabaja con tubos o frascos que no están cerrados herméticamente.

2.5.3 Parámetros para evaluar resistencia térmica de microorganismo

La importancia de los tratamientos térmicos radica en la inactivación de los microorganismos patógenos que puedan causar daños a la salud pública, así como afectar las propiedades sensoriales del alimento. Para un tratamiento térmico adecuado se consideran dos parámetros cinéticos que permiten observar o predecir la efectividad de dicho tratamiento, estos son los valores D y Z. (Stumbo, 1973).

El tiempo de esterilización o de pasteurización no incluye el tiempo de penetración de calor o el tiempo necesario para alcanzar la temperatura a la cual se desea llevar a cabo el proceso, así el efecto de un tratamiento térmico vendrá dado principalmente por la temperatura blanco (temperatura de tratamiento), pero existe también un aporte de la temperatura de calentamiento y de enfriamiento en el proceso (Lightfoot y Maier, 1998).

2.5.3.1 Valor D

El valor D o tiempo de reducción decimal, corresponde con el tiempo necesario para disminuir a un 10% la población inicial, es decir; el tiempo que toma acabar con un 90% de la población bacteriana inicial, a una temperatura fija (Shull y col, 1963). Numéricamente corresponde a los minutos necesarios para que la curva de sobrevivencia atraviese un ciclo logarítmico. Matemáticamente es

igual al recíproco de la pendiente de la curva de sobrevivencia y es una medida de la tasa de muerte de un organismo (Figura 4A) (Jay, 2005).

2.4.1.1 Valor F

El valor F o “valor de esterilización” mide la letalidad del tratamiento por calor y es el tiempo necesario a una temperatura de referencia, para lograr la inactivación o destrucción de las células vegetativas o esporas de un particular organismo. El mismo se calcula en base a tres variables: el valor D, a una determinada temperatura; las cargas microbianas iniciales presentes y por último; las cargas microbianas finales que se desee (Pflug, 1987).

2.4.1.2 Valor Z

El valor Z representa los grados de temperatura necesarios para que la curva de destrucción térmica atraviese un ciclo logarítmico o el cambio de temperatura que se requiere para modificar el valor D por un factor de 10. Matemáticamente este valor es igual al recíproco de la pendiente de la curva TDT (tiempo de muerte térmica), que se construye con los valores D vs temperatura (Figura 4B) (Jay, 2005).

Mientras D refleja la resistencia de un organismo a una temperatura específica, Z provee información de la resistencia relativa de un organismo a diferentes temperaturas destructivas, lo que permite el cálculo de procesos térmicos equivalentes a diferentes temperaturas (Jay, 2005).

La muerte de microorganismos como consecuencia de un tratamiento a altas temperaturas sigue una cinética de primer orden. Si se representa la variación del logaritmo del número de células supervivientes a un tratamiento térmico realizado a una temperatura dada en función del tiempo de

tratamiento, se obtiene una gráfica del descenso del logaritmo de supervivientes que es lineal con el tiempo (Shull y col, 1963).

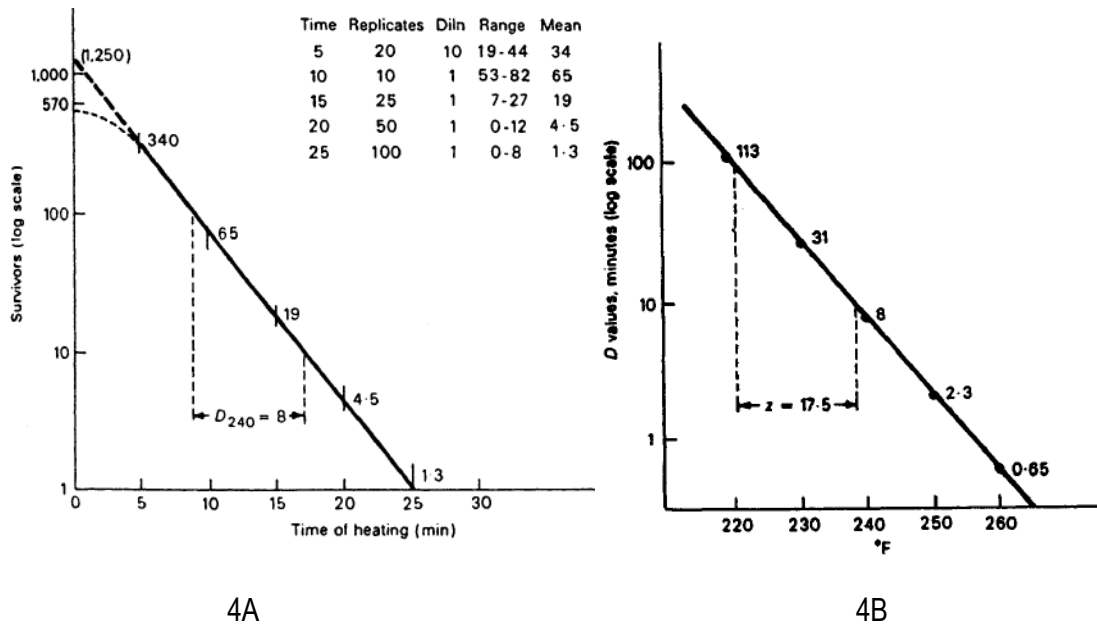


Figura 4. Esporas de cepas F.S.7 calentadas en guisantes. 4A) Curva de muerte térmica; 4B) curva de tiempo de muerte térmica (Jay, 2005).

2.5 Microorganismos riesgo: contaminantes frecuentes aislados de proceso y potenciales de riesgo

2.5.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Cocos o bacilos gram positivos, catalasa negativos, no formadores de esporas, generalmente inmóviles. No poseen porfirinas ni citocromos, no llevan a cabo transporte de electrones vía fosforilación, por lo que obtienen la energía exclusivamente a través de la fosforilación a nivel de sustrato. Todas las BAL crecen en ausencia de oxígeno, aunque éste no les es tóxico por lo que se les denomina anaerobios aerotolerantes (Madigan y col, 2003). Al desarrollarse mejor en ambientes anaerobios, su principal vía de producción de energía es la fermentación, diferenciándose dos tipos: homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras producen únicamente ácido láctico como

resultado de la fermentación, todos estos utilizan la ruta Embden-Meyerhof-Parnas que lleva a la producción de 2 moles de ácido láctico a partir de 1 mol de glucosa. A diferencia de éstas, las heterofermentativas producen cantidades equimolares de ácido láctico, etanol y CO₂ a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas para producir la mitad de la energía que las homofermentativas (Kandler, 1983). La diferencia en el tipo de metabolismo fermentativo radica fundamentalmente en la presencia de un enzima clave de la glucólisis: la aldolasa, ausente en los heterofermentadores (Madigan y col, 2003).

Las BAL tienen en general un amplio rango de diversidad genética y de hábitats, por lo que no presentan como grupo, limitaciones generales para pH, a_w , temperatura u otros parámetros; por lo que pueden encontrarse en un amplio rango de ambientes. Muchas BAL crecen mejor a pH= 6-7, muchos *Lactobacillus* y *Oenococcus oeni* son acidófilos por lo que toleran bajos rangos de pH (4.2-4.8) (Backburn, 2006). Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento el espectro es también muy amplio, encontrándose un rango de óptimos crecimiento entre 0-55°C (Backburn, 2006).

Dentro de este grupo se tienen a: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* (Jay, 2005). El género *Lactobacillus* comprende a uno los contaminantes más frecuentes de la bebida a base de malta, este tipo de bacterias ácido láctica tienen forma de bastones, presentan una mayor resistencia a condiciones ácidas que la mayoría de las BAL logrando crecer a pH cercanos a 4; esto permite su continuo crecimiento durante las fermentaciones lácticas naturales, momento en el que el pH desciende tanto que la mayoría de las BAL ven inhibido su crecimiento. (Madigan y col, 2003).

2.5.2 Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares eucariotas, presentan generalmente forma ovalada, esférica o cilíndrica; con tamaños que oscilan entre 1-9 μm de ancho y 2-20 μm de largo dependiendo de la especie, nutrición, edad y otros factores. (Carlile y col, 2001). Su proceso de reproducción es generalmente por gemación, proceso en el cual la célula hija crece como un apéndice de la célula madre hasta alcanzar su completo desarrollo para luego separarse de la misma. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en hábitat con azúcares, como frutos, hojas, flores, cortezas de árboles; algunas viven en simbiosis con animales en especial insectos; mientras otras pueden ser patógenas para estos, incluido el hombre (Madigan y col, 2003).

Son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, aprovechando su metabolismo de fermentación alcohólica; obteniéndose así productos fermentables como panes, productos de pastelería, bebidas alcohólicas (cerveza, cidra, vino, etc) (Querol y Fleet, 2006).

Las levaduras son consideradas los microorganismos primarios de daños en productos carbonatados debido a su capacidad para tolerar altos volúmenes de carbonatación, además toleran bien las condiciones ácidas debido a que presentan un amplio rango de pH de crecimiento (1.5-8.5) con un rango entre 3 y 6.5 (Sperber y Doyle, 2009). Así, el daño por levaduras se ve favorecido en productos con bajo pH, por lo general bajo 5.5, además la presencia de azúcares, ácidos orgánicos u otras fuentes de carbonos metabolizables son aprovechadas por éstas para estimular el crecimiento y producir daño en el producto final. Las bebidas carbonatadas representan un medio ideal para las levaduras, esta matriz presenta un medio rico en azúcares fácilmente metabolizables además de un pH muy bajo que favorece la reproducción de las mismas. (Blacburn, 2006).

2.5.3 Bacterias formadoras de esporas

Son importantes causantes de daño en alimentos, comúnmente asociados a alimentos que reciben tratamientos térmicos para su preservación. La principal característica de estos microorganismos es la capacidad de producir una estructura de resistencia (endospora) que permite mantenerse en un estado de latencia (caracterizado por un metabolismo muy disminuido) por largos periodos de tiempo (Nicholson y col, 2000), lo que los dota de una aumentada resistencia a estreses ambientales como pueden ser: privación de nutrientes necesarios para el crecimiento, presencia de compuestos químicos dañinos, altas o bajas temperaturas, entre otros; que normalmente matarían a la célula vegetativa. (Blackburn, 2006). Una vez se restituyen condiciones óptimas para la bacteria, la forma latente puede volver a su estado vegetativo y reiniciar su normal metabolismo (Hansen y col, 1970).

Los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* y *Desulfotomaculum* son capaces de formar esporas; siendo los dos primeros los más comúnmente encontrados en la industria de los alimentos y bebidas (Huesca y col, 2014); a pesar de estar inhibidos por el bajo pH, las esporas de éstos mantienen viables en este tipo de productos (Back, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Establecer las combinaciones de tiempo y temperatura óptimas para un procedimiento de pasteurización que asegure la estabilidad microbiológica de una bebida carbonatada, no alcohólica a base de malta.

3.2 Objetivos específicos

- Adaptar microorganismos extraídos de cepario (contaminantes frecuentes aislados de procesos) a las características de la bebida.
- Evaluar la estabilidad de los microorganismos adaptados, en el tiempo, para valorar la susceptibilidad de la bebida a la contaminación microbiológica.
- Estudiar la resistencia térmica de los microorganismos adaptados, a diferentes combinaciones de tiempo y temperaturas.
- Calcular parámetros D, F y Z de los microorganismos más resistentes, para evaluar las combinaciones de tiempo y temperatura necesarias que aseguren la inocuidad y calidad del producto.
- Probar a nivel de laboratorio las condiciones de tiempo y temperatura propuestas en el apartado anterior en muestras naturalmente contaminadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y soluciones

- Ácido tartárico 10% p/v.
- Agar bacteriológico TMBecton & Dickinson.
- Caldo diferencial para *Clostridium* Merck.
- Carne cocida Oxoid.
- Dextrosa TMBecton & Dickinson.
- Etanol absoluto (96% v/v).
- Extracto de levadura TMBecton & Dickinson.
- Infusión cerebro corazón Oxoid.
- Kit de reactivos para Tinción Gram bioMérieux® S.A.
- NaCl 0,85% p/v.
- NBB Döhler.
- PCA Merck.
- PDA Merck.
- Peptona bacteriológica TMBecton & Dickinson.
- Peróxido de hidrogeno 30% Honeywell.

- Tiras para pruebas de oxidasa Merck.
- VLB-S7S Sifin.

4.2 Materiales y Equipos

- Asas de siembra de plástico estériles desechables COPAN.
- Autoclave HIRAYAMA.
- Balanza electrónica SCOUT PRO OHAUS.
- Baño Thermo Scientific Precision Serie 280.
- Bolsas para desechos biológicos resistentes a esterilización por autoclave.
- Bomba de vacío.
- Botellas con tapa de goma.
- Botellas de vidrio PYREX capacidad de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Cámara de Neubauer BOECO Germany.
- Campanas de flujo laminar: NUAIRE Clase II tipo A/B3; LABCONCO Clase II tipo A2.
- Congelador ajustado a -80°C ISHIN BioBase.
- Cronómetro.
- Cubreobjetos Marienfield Superior.
- Esterilizador autoclave vertical Hirayama modelo HA-MII.

- Filtros de membrana Minisart® y NALGENE®. Diámetro de poro = 0.2 µm.
- Filtros de membrana Sartorius® y Millipore®. Diámetro de poro = 0.2 µm, 0.45 µm.
- Incubadora Barnstead Lab-Line Imperial III (modelo 305) ajustada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Incubadora Precision Scientific (modelo 2EG) ajustada a $32 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Incubadora Thermo Scientific ajustada a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Indicador de anaerobiosis Oxoid.
- Jarras de anaerobiosis Anaerocult®.
- Jeringa estéril descartable 60 mL GAESCA.
- Microscopio NIKON óptico (OPTIHOT-2) y estereoscópico (SMZ-U).
- Papel Parafilm American National Cam.
- Pinzas de acero inoxidable Millipore.
- Pipetas automáticas simples GILSON: p10 y 5 mL; p1000, 200, 20 y 10 µL.
- Placas de Petri estériles 90 x 15 y 60 x 15 mm.
- Portaobjetos L & M Germany.
- Puntas estériles para pipetas automáticas p10 y 5 mL, y p1000, 200, 20 y 10 µL.
- Sistema para producción de medio anaeróbico ANAEROCULT® Merck.
- Sistemas de anaerobiosis para incubación ANAEROGEN® Compact Oxoid.

- Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL de capacidad.
- Tubos de ensayo de 18 x 60 mm.
- Tubos para preservación en cepario Microbank.
- Unidad de filtración de acero inoxidable Sartorius.
- Vortex L&M modelo LE-345.

4.3 Microorganismos a estudiar

4.3.1 Levaduras

- *Pichia anómala*
- *Candida guillermondii*
- *Candida peliculosa*
- *Saccharomyces pastorianus ssp. Carlbergensis*
- *Rhodotorula rubra* aislada de proceso
- *Rhodotorula rubra* extraída de cepario
- *Rhodotorula mucilaginosa*

4.3.2 Bacterias ácido lácticas

- *Lactobacillus brevis*
- *Lactobacillus paracasei*

4.3.3 Esporulados

- *Clostridium bifermentans*
- *Clostridium acetobutylicum*
- *Clostridium butyricum*

4.3.4 Patógenos

- *Salmonella anatum*
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli* O157:H7

4.4 Metodología

4.4.1 Adaptación de microorganismos de cepario a la matriz de la bebida

Los microorganismos están dispuestos en borlas almacenados en frío (- 80°C), se extrajo cada una de estas borlas y se sembraron por agotamiento en una placa con un agar específico para cada microorganismo (tabla 1). Una vez obtenidas las colonias, se tomó una asada y se inoculó en un caldo de cultivo específico para cada microorganismo hasta observar la turbidez que evidenció el crecimiento microbiano. Observada la turbidez en el caldo se tomó 1 mL de ese cultivo y se dispuso en un tubo estéril contentivo de: 1 mL de malta y 8 mL de caldo; se llevó a incubación hasta observar nuevamente la turbidez que señala el crecimiento microbiano.

Tabla1. Medios sólidos y líquidos usados para cada grupo de microorganismos, a lo largo de toda la investigación.

Cepa	Caldo	Agar
Levaduras	YPD	PDA acidificado con ácido tartárico
<i>Lactobacillus</i>	NBB Döhler	NBB Döhler
Esporulados	DRCM	DRCM

Paulatinamente se fue aumentando el volumen de malta y disminuyendo el de caldo, hasta observar crecimiento solo en la matriz de estudio (100% malta). Los volúmenes para la adaptación se muestran en la tabla 2.

A lo largo del proceso de adaptación se hizo un seguimiento de cada microorganismo, mediante la siembra en agares diferenciales y/o selectivos, descritos en el apartado anterior; así como pruebas

bioquímicas (tinción gram, prueba de la oxidasa y catalasa) que aseguran el mantenimiento del microorganismo de interés y que descartan así cualquier tipo de contaminación en el proceso de adecuación.

Tabla 2. Volúmenes usados durante la adaptación de microorganismos de cepario a la malta.

Experiencia	Caldo de cultivo (mL)	Malta (mL)	Cultivo (mL)
0	10	0	1 asada
1	8	1	1
2	7	2	1
3	6	3	1
4	5	4	1
5	4	5	1
6	3	6	1
7	2	7	1
8	1	8	1
9	0	9	1

4.4.2 Pruebas de identificación bioquímica

4.4.2.1 Tinción Gram

Para esta prueba se tomó una colonia del microorganismo de interés y se realizó un frotis sobre un portaobjetos, hasta dejar secar. Una vez seco, se agregaron dos gotas de cristal violeta dejándolo en contacto por un minuto; se lavó el portaobjeto y se agregó lugol por un minuto. Se dejó correr agua desde la esquina superior del cubreobjetos para escurrir el exceso, acto seguido se agregó, evitando el contacto directo con el frotis, la solución de acetona/alcohol la cual se mantuvo en contacto por diez segundos, se lavó nuevamente con agua. Se añadió el último colorante (rojo de safranina) por

30 segundos, trascurrido el tiempo se lavó con agua, se dejó secar y se observó en el microscopio la coloración que presentaron las bacterias (MacFaddin, 2004).

4.4.2.2 Prueba de la catalasa

Para la prueba de la catalasa se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre un cubreobjetos, con un asa estéril se tomó una colonia del microorganismo en cuestión y se dispuso sobre el peróxido de hidrógeno. Se observó si se presentaba o no la formación de burbujas (MacFaddin, 2004).

4.4.2.3 Prueba de la Oxidasa

Para determinar la presencia de la enzima citocromo C-oxidasa se llevó a cabo la prueba de la oxidasa que consistió en tomar una colonia bacteriana con un asa estéril y frotarla sobre la zona reactiva de la tiras para pruebas de oxidasa, pasados 30 segundos se comparó el resultado con la escala colorimétrica ofrecida por la casa comercial, para una reacción positiva o negativa (Merck, 2012).

Solo para aquellas cepas que lograron adaptarse parcialmente (70% malta) o totalmente a la matriz se les hizo el posterior análisis por medio de la metodología de los retos microbianos.

4.4.3 Retos microbianos

Los microorganismos a los cuales se les hizo el ensayo, se dejaron creciendo en 100% malta (o en su defecto el volumen de malta máximo con el cual mostraron crecimiento) 48-72 horas antes de llevar a cabo el estudio.

Se estimó la concentración de cada uno de los microorganismos mediante la técnica de contaje directo en cámara de Neubauer. Previo a realizar el contaje se aseguró de que el inóculo a colocar en la cámara de recuento permitiese el conteo de microorganismos, realizando las diluciones pertinentes en caso de ser necesario.

Para realizar la estimación celular de cada microorganismo, se dispuso en la campana de flujo laminar la cámara de Neubauer, cubriéndola con el respectivo portaobjetos. Con una pipeta automática (p10 o p20) se inocularon 10 μ L de la suspensión bacteriana en cada una de rejillas dispuestas para contar, para obtener un duplicado. Se llevó la cámara al microscopio y se contó, bien sea los 25 cuadros dispuestos para esto o contar 5 y multiplicar dicho valor por 5 (estimado de los 25 cuadros). Para estimar el valor de la concentración en la suspensión se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 3: } \frac{cel}{ml} = 10^4 \times n^{\circ}cel \times FD$$

Dónde:

[cél/mL]= concentración de células/ mililitro

n° cél= número de células contadas en los 25 cuadros

FD= factor de dilución en caso de haberse alguna dilución previo a la inoculación en la cámara

Partiendo de la concentración de cada microorganismo, se calculó el volumen de inóculo necesario para alcanzar concentraciones de 100 y 1000 cél/mL en 100 mL de malta; dicho volumen se dispuso en unos tubos de vidrio tapados que permitían en la medida de lo posible el mantenimiento de la carbonatación. Una concentración de 1000 cél/mL en 100 mL de malta es equivalente a un total de 1.5×10^5 células en total; 1.5×10^4 para una concentración de 100 cél/mL.

Posteriores tratamientos con concentraciones iniciales de 0,01; 0,1; 1 y 10 cél/mL; se realizaron para aquellos microorganismos que presentasen crecimiento con las concentraciones mayores.

Si se considera que por cada 1000 μL hay una cantidad de células L , entonces el cálculo para el volumen a inocular vendrá dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 4: } M = \frac{1.5 \times 10^5 \text{ células} \times 1000 \mu\text{L}}{L}$$

Dónde:

M = Volumen (μL) de suspensión a inocular

L = Concentración de la suspensión (sin diluir)

Como ejemplo: si se obtiene una concentración de 3×10^6 cél/mL o lo que es igual, se tienen 3×10^6 (L) células por cada 1000 μL ; entonces el volumen a inocular (M) de la suspensión sin diluir sería de 50 μL para alcanzar una concentración de 1000 cél/mL.

Procurando que el volumen de inóculo esté entre 50 μL (para asegurar la probabilidad de captura) y 400 μL (evitar un exceso con valores por encima de éste); en caso de salirse de este rango se hicieron diluciones con el fin de inocular dichos volúmenes. Siguiendo el ejemplo anterior, sería equivalente inocular 500 μL partiendo de una dilución 1/10 de la suspensión original. El cálculo para alcanzar concentraciones de 100 cél/mL es equivalente.

En frascos de vidrio con tapas de goma estériles, se colocaron los 100 mL de malta, con una pipeta automática se inculó volumen previamente calculado para alcanzar la concentración requerida. Estos tapones de goma permitirán mantener el mayor tiempo posible, la carbonatación de la bebida, condición en la cual está el producto en el mercado.

Una vez inoculado cada microorganismo en cada tubo, se filtraron en membrana 10 mL semanalmente, partiendo desde el día de la inoculación (t_0), para de esta forma evaluar el comportamiento de cada cepa en el tiempo, en la matriz. Las filtraciones se hicieron en una unidad de filtración de acero inoxidable estéril conectada a una bomba de vacío, usando una pinza estéril se colocaron membranas de 0.2 μm en la frita de la unidad de filtración; estas membranas permitían retener los microorganismos presentes en el líquido, dejando que este último sea desechado. Con la pinza estéril se tomó la membrana y se llevó a una placa con medio solidificado (tabla 1), se llevaron posteriormente a incubación a las condiciones óptimas de crecimiento según sea el caso. Las evaluaciones se realizaron dos veces a las semanas con tres días intermedios entre una medición y la siguiente, durante 4 semanas o hasta alcanzar una concentración de 10^7 cél/mL. Cada ensayo se hizo por duplicado.

4.4.4 Ensayos de resistencia térmica

Se realizaron con todos los microorganismos adaptados en el apartado 4.4.1, a través del método de los viales (Stumbo, 1973). 48-72 horas antes del ensayo, se dejó crecer el microorganismo a probar, en agares que permitan el crecimiento del mismo (para así asegurar el uso de células viables, tabla 1), se extrajeron con un asa estéril varias colonias y se dispusieron en agua peptonada 0,1% p/v; usando la cámara de Neubauer se estimó alcanzar una concentración de 10^8 cél/mL, colocando más colonias en la suspensión en caso de estar por debajo, o diluyendo en caso de estar por encima de 10^8 cél/mL.

El baño térmico se colocó a las distintas temperaturas de ensayo: comenzando con 62°C , luego 65°C y finalmente 68°C .

En tubos de ensayo de 18 x 60 mm, se añadieron 4,95 mL de malta en cada uno identificado según la temperatura de ensayo y tiempo de exposición establecido (0, 1 ½, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 20 min). Los tubos se situaron en el baño a temperatura controlada hasta alcanzar la temperatura requerida, para esto último se insertó un termómetro en uno de los viales que contenía la bebida (este tubo no se inoculó).

Una vez alcanzada la temperatura se inocularon 50 µl (0,05 mL) del microorganismo a evaluar (dilución 1/100) en cada uno de los tubos. Cumplido el tiempo de tratamiento, se sacó el tubo y se colocó en agua con hielo (aproximadamente 2 - 5°C) para detener el tratamiento térmico.

Posterior a esto se sembró por superficie el contenido de cada uno de los tubos en agares idóneos para el crecimiento de cada microorganismo (tabla 1), además de distintos controles (malta, inóculo inicial); se llevó a incubación por el tiempo necesario y se contó el número de UFC contenido en la placa.

Para los microorganismos que lograron resistir tratamientos con 68°C por el tiempo máximo, se repitió el ensayo probando temperaturas de 70 y 72°C.

4.4.5 Cálculos de valores D, F y Z

Estos parámetros fueron calculados solo para los microorganismo que presentaron una mayor prevalencia en la matriz y presentaron una mayor resistencia a la temperatura más alta probada (*Rhodotorula rubra* aislada de la bebida, *Pichia anómala*, *Candida guilliermondi*, *Candida peliculosa*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus paracasei*). Para el cálculo del valor D, se graficaron entonces los valores de tiempo de calentamiento en función del número de sobrevivientes y se obtuvo el valor de la pendiente, cuyo recíproco corresponde con el valor D para esa temperatura y para ese

microorganismo. Se construyó luego la respectiva grafica con los valores D vs temperaturas probadas, el recíproco de la pendiente de dicha recta correspondiendo con el valor Z. (tabla 6). Mientras que el cálculo del valor F se llevó a cabo mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 5: } F = D(\log N_o - \log N_f)$$

Donde:

No: cantidad de microorganismos por unidad de volumen presente en el alimento previo a su procesamiento térmico

Nf: cantidad de microorganismos se desea permanezcan después de la aplicación del calor

4.4.6 Pruebas a nivel de laboratorio de condiciones de tiempo y temperatura propuestas

Partiendo de los valores D, F y Z y usando los microorganismos que mostraron la mayor termorresistencia, se llevó a cabo el siguiente ensayo:

Se simuló a nivel de laboratorio un procedimiento de pasteurización con muestras naturalmente contaminadas. Se dispusieron en botellas estériles, 250 mL de la bebida a base de malta pasteurizada, se inoculó en las mismas el microorganismo en cuestión y se colocaron en un primer baño a 80°C, se mantuvieron en dicho baño hasta alcanzar la temperatura del tratamiento a probar (62°C y 65°C).

Una vez alcanzada dicha temperatura se llevaron a un segundo baño (previamente colocado a 62°C, 65°C y 68°C según fuese el caso) y se mantuvo durante 12 minutos (tiempo de tratamiento, mismo a usar en planta).

Transcurrido dicho lapso de tiempo, se llevaron las botellas a un tercer baño térmico a 40°C, se mantuvo hasta alcanzar dicha temperatura y se sacaron las botellas hasta que su contenido alcanzase la temperatura ambiente. Seguido de esto se filtró el contenido de la botella y se colocó la membrana en un agar específico para el microorganismo (tabla 1) evaluado y se llevó a incubación en las condiciones óptimas para su crecimiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Adaptación de microorganismos de cepario a la matriz de la bebida

Previo al estudio de retos microbianos debe tomarse en cuenta el impacto que puede significar un medio, en principio poco propicio para el crecimiento, como puede serlo la bebida a base de malta, para la recuperación de los microorganismos elegidos para retar la matriz.

La tolerancia al estrés de un microorganismo en particular vendrá dada por la composición genética del mismo, pudiendo variar la resistencia entre organismos dentro de una misma población lo que conlleva a una heterogeneidad en la resistencia al estrés celular. (Smits y Brul, 2005). Así, solo aquellas células dentro una población que logren adaptar su fisiología al medio dañino (como podría significarlo la bebida a base de malta) o que tengan ya características intrínsecas que les permitan sobrevivir en dicho medio, verán un aumento en su población obteniéndose así poblaciones de microorganismos en la bebida en particular y aumentado en consecuencia la posibilidad de la pérdidas de las propiedades sensoriales de la misma.

Diversos estudios han demostrado que los microorganismos pueden aumentar su resistencia a entornos estresantes al estar en contacto con dichas condiciones enalteciendo así su capacidad para soportar tensiones letales posteriores de la misma o de diferente naturaleza (Chung y col, 2006). Por ejemplo, la adaptación ácida de *E. coli* O157: H7 o células de *Salmonella* antes de la inoculación pueden influir en gran medida en su capacidad para sobrevivir cuando se inoculan en un alimento ácido (IFD, 2001).

Por esta razón se llevó a cabo la adaptación de las distintas cepas, a ensayar mediante retos microbianos con el fin de obtener poblaciones de microorganismos que pudieran soportar las condiciones de la bebida y con esto aumentar la sensibilidad del estudio de los referidos retos.

La figura 5 muestra la prevalencia de las levaduras *Pichia anómala*, *Candida guillemondii*, *Candida peliculosa*, *Saccharomyces pastorianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula rubra aislada* y *Rhodotorula rubra de cepario* en el producto, obteniéndose crecimiento en un volumen compuesto totalmente por la bebida a base de malta; esta prevalencia en el producto viene dada por un compendio genético que dota a estos microorganismos de propiedades para crecer en ambiente con bajo pH, alta carbonatación y elevados niveles de azúcares como lo significa este tipo de bebidas (Madigan y col, 2003).

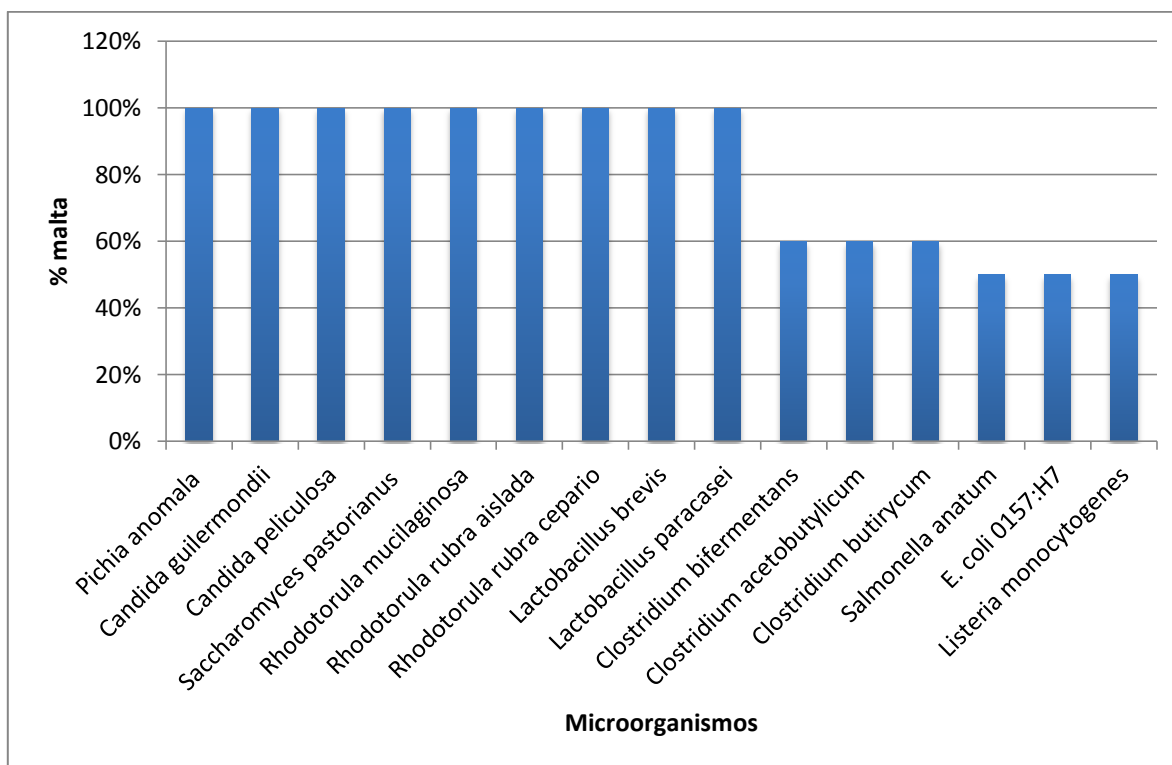


Figura 5. Adaptación de microorganismos de cepario a la bebida no alcohólica carbonatada a base de malta.

De bebidas con algunas características similares a la del producto donde se llevó a cabo la adaptación, se han podido aislar distintas cepas de levaduras que evidencian su ubicua capacidad de proliferación en este tipo de productos (Sand y Van Grinsven, 1976; Tournas, 2006; Stratford and James, 2003; Ashurst, 2016).

En bebidas ácidas carbonatadas y jugos de frutas, los niveles de oxígeno son usualmente bajos y los niveles de dióxido de carbono muy altos, por lo que el daño vendrá dado en principio, especialmente por microorganismos anaerobios facultativos (Ashurts, 2016). Sin embargo, las levaduras son microorganismos frecuentemente encontrados en ambientes como el de las bebidas ácidas carbonatadas debido a que presentan una intrínseca resistencias a ambientes con bajos pH y altos volúmenes de carbonatación, características propias de este tipo de bebidas (Sperber y Doyle, 2009).

El rango óptimo de pH para el crecimiento de este tipo de microorganismos eucariotas va desde 3 hasta 7, por lo que el deterioro por este tipo de microorganismos se ve favorecido en alimentos y bebidas con bajos pH (Sperber y Doyle, 2009; Jay, 2005). Además la presencia de azúcares, ácidos orgánicos y otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables son aprovechadas por este tipo de microorganismo para estimular el crecimiento y en consecuencia alterar el producto final (Blackburn, 2006).

En términos generales, el rango de pH de alimentos y bebidas se extiende desde pH 2,5 hasta pH 7.5. Como se mencionó previamente, los alimentos ácidos están particularmente asociados con el deterioro por levaduras, éstos involucran desde las bebidas tipo cola de bajo pH, aproximadamente pH 2,5, sidra, vino y bebidas ácidas carbonatadas, aproximadamente pH 2,8-3,4, hasta los zumos de frutas que van desde pH 3,0 en limón verde o pomelo a pH 4,0-4,5 en jugos maduros de manzana o tomate (Hicks, 1990). Así, las bebidas carbonatadas en general presentan además de un pH que entra en el rango de crecimiento de las levaduras, una gran cantidad de azúcares aprovechables por estos microorganismos (Deak, 1991) por lo que su crecimiento durante la adaptación en un producto como la bebida a base de malta era predecible.

Por su parte la figura 5 muestra además, la enorme capacidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) para crecer en un medio como el ofrecido por la bebida. Como todos los microorganismos, las BAL presentan distintos requerimientos para su crecimiento, como presencia de nutrientes, temperaturas, presencia o ausencia de oxígeno entre otros. El pH es uno de los factores más importantes que permiten el crecimiento de este grupo (Mentz y col, 2010). Como se observa en la figura 3, en general las bacterias tienen rangos más estrechos de pH para su crecimiento, que el caso de mohos y levaduras (Jay, 2005). Sin embargo microorganismos como algunas bacterias ácido lácticas han sido aislados de bebidas similares al producto en cuestión (Ashurst, 2016; Foster y Vasavada, 2003).

Las BAL en general se desarrollan mejor en ambientes anaerobios, siendo su principal vía de producción de energía, la fermentación, los cuales son de dos tipos: homofermentativas y heterofermentativas, diferenciándose una de la otra por los productos finales formados (Madigan y col, 2003). Los *Lactobacillus* son exclusivamente homofermentativos, generando energía vía glucólisis 2 moléculas de ácido láctico por molécula de glucosa consumida (Kandler, 1983). Los azúcares presentes en la bebida ofrecen un sustrato óptimo para la producción de energía por parte de los *Lactobacillus*, su metabolismo meramente fermentativo ofrece una vía de crecimiento en ausencia de oxígeno (Madigan y col, 2003).

Aunado a esto, durante la fermentación láctica el pH en el medio desciende hasta un punto en el que muchas de las bacterias ácido lácticas ven inhibido su crecimiento (Juvonen y col, 2011), sin embargo los *Lactobacillus* que pueden crecer en medios con pH cercanos a 4 (Madigan y col, 2003), son entonces capaces de resistir el pH de la matriz.

Considerando entonces que estos microorganismos encuentran en la bebida a base de malta todos los nutrientes para el aumento de biomasa, además de que su carácter de anaerobio facultativo les

permite crecer en ausencia o presencia de oxígeno y aunado a esto su intrínseca resistencia a bajos pH como el de la bebida, se presumía que los *Lactobacillus* con las que se trabajó, encontrarán en la bebida un medio óptimo para su crecimiento, adaptándose al mismo sin mayores inconvenientes, como los resultados así lo evidencian.

Asimismo, la figura 5 muestra que los miembros pertenecientes al grupo de los *Clostridium* no pudieron desarrollar crecimiento con un porcentaje de malta superior al 60%, por lo que los miembros de este grupo no pudieron ser adaptados a la matriz de la bebida.

Los miembros del género *Clostridium* presentan un óptimo de crecimiento con un rango de pH ubicado entre 6,5-7 (Talaro y Chase, 2015) valores alejados de éste óptimo significan un estrés para la célula tal, que compromete su crecimiento mientras persista ésta condición. En general el pH de las bebidas ácidas carbonatadas y muchos jugos de frutas flanquea en el rango de 2.3 y 4 (Ashurts, 2016), valores alejados del óptimo de crecimiento para muchos microorganismos.

Como se mencionó previamente, en bebidas ácidas carbonatadas, donde los niveles de oxígeno son bajos, el deterioro estará principalmente representado por microorganismos anaerobios estrictos o facultativos. Si bien miembros del género *Clostridium* son anaerobios estrictos, los mismos ven mermado e imposibilitado en algunos casos su crecimiento, debido al bajo pH que en general tienen las bebidas carbonatadas (Ashurts, 2016). Sin embargo estos microorganismos presentan dos características que los hacen de especial cuidado en la industria alimentaria. Por un lado, la capacidad de mantenerse viables cuando las condiciones no son idóneas, mediante la formación de una estructura de resistencia (endospora) que les permite mantenerse en un estado de latencia (donde el metabolismo está muy disminuido) por largos periodos de tiempo, soportando así condiciones de estrés ambiental, como puede serlo el bajo pH (Nicholson y col, 2000). Y por otro

lado, la capacidad de estimular nuevamente la germinación cuando la matriz en la que están embebidas presenta las condiciones óptimas para su crecimiento (Hansen y col, 1970), es justamente esta última característica la que los hace de especial cuidado en la industria alimentaria (Blackburn, 2006).

Así, la poca capacidad de crecimiento por parte de los *Clostridium* en la bebida puede verse explicado por la disminución de pH consecuencia del aumento en los volúmenes de malta, alejándose así la matriz de los valores óptimos para el crecimiento de estos microorganismos y con esto inhibiendo el crecimiento de los mismos. Sin embargo cabe la posibilidad de que estos estén latentes bajo la forma de esporas. Considerando esta posibilidad de sobrevivir en el producto los representantes del género *Clostridium* se llevaron al ensayo de los retos microbianos para observar así su comportamiento en la matriz.

Por otro lado, los resultados mostrados en la figura 5 evidencian la limitada capacidad de *E.coli* 0157:H7, *Salmonella anatum* y *Listeria monocytogenes* para mantenerse en la bebida al aumentar los volúmenes de malta, encontrándose que el medio líquido compuesto por un 50% de volumen de la bebida a base de malta pareciese ser suficiente para limitar el crecimiento de estas cepas patógenas.

Considerando que el pH óptimo de crecimiento para las tres cepas se encuentra en el rango de 5 y 9, con un óptimo entre 6 y 7 (Garrity y col, 2004), se esperaba que ninguna de estas bacterias patógenas lograra la adaptación al ir aumentando los volúmenes de la bebida a base de malta. Esto debido a la disminución de pH que significa el agregado de la misma al caldo de crecimiento.

Sin embargo, Medina y col, (2007); informaron que *Escherichia coli*, una especie de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* no mueren inmediatamente al inocularlas en bebidas carbonatadas,

estudiaron su comportamiento en distintas bebidas. Al mantener el contacto por 5 min con distintos jugos que presentaban todos un pH de 4, no hubo una reducción mayor a una unidad logarítmica. Las bacterias sobrevivieron además los 5 minutos de contacto en yogur (pH 4,6) y una bebida a base de cola (pH 2.7) (Medina y col, 2007).

Debe considerarse que el trabajo previamente citado no muestra el efecto por tiempos de exposición mayores a 5 minutos, hecho que puede llevar a inferir que el efecto bactericida que no permitió el crecimiento de alguno de estos patógenos, en volúmenes altos de malta; pueda deberse a algún componente presente en la bebida, o igualmente la falta de algún componente necesario (alguna vitamina, aminoácido u otro componente).

Otro factor a tener en consideración es que esta adaptación se llevó a cabo de manera cualitativa por lo que se desconocen las concentraciones en los volúmenes de inóculo al ir aumentando los volúmenes de malta.

La disminución de una unidad logarítmica tras la breve exposición comprueba el efecto que puede tener un medio “estresante” para estos microorganismos que vienen de un largo periodo de latencia en el medio de criopreservación.

En otros resultados, Sheth y colaboradores (1988); hallaron sobrevivencia de estos patógenos en la leche y en la bebida de cola durante un máximo de 48 horas. Aunado a esto, se han reportado casos de intoxicación alimentaria asociados con la contaminación de jugo de manzana fresco por *E. coli* O157 (Battey y Schaffner, 2001; Czajka y Batt, 1996;; Parish, 1997, 2000; Splittsoesser et al., 1996), encontrándose que este organismo era capaz de crecer en esta matriz de bajo pH, equivalente al de la bebida a base de malta; por lo que el pH si bien tiene un conocido efecto bactericida en la

mayoría de los microorganismos, no parece significar una barrera de protección en contra de estos microorganismos.

Sin embargo, en 1992 Glass y colaboradores, concibieron un experimento en el que se llevó a cabo el crecimiento de *E. coli* 0157:H7 a distintos niveles de pH, partiendo de un pH de 5 y disminuyéndolo paulatinamente (usando HCl). Cuando el pH se fijó a 4.5 se encontró una prolongación de la fase de retraso de 0.8 a 4.7 horas, dicha extensión del tiempo para iniciar el crecimiento puede interpretarse como una disminución en la capacidad de las distintas células de la cepa para adaptarse al nuevo medio lo que evidencia un medio poco propicio para el crecimiento de este patógeno. Al disminuir el pH a valores de 4 y 3.5 cesaba el crecimiento midiéndose una disminución de 4 unidades logarítmicas entre los 17 y 10 días respectivamente.

La bibliografía parece ser contradictoria en lo referente al pH y el crecimiento de la cepa *E. coli* 0157:H7; si bien en el trabajo de Glass y col, se usa HCl para disminuir el pH, se sugiere que en la bebida a base de malta puedan existir componentes que de alguna manera amortigüen el efecto del bajo pH de la bebida, o por otro lado; que el componente usado (HCl) para variar el pH en dicho estudio tiene un efecto bactericida que va más allá de perturbar el pH interno del microorganismo.

Los tres géneros de los patógenos ensayados son anaerobios facultativos (Garrity y col, 2004). Por ello ambiente parcialmente anaerobio que se suscitaba al añadir la bebida carbonatada podría no significar una barrera para el crecimiento de estos microorganismos. Cabe destacar que en ausencia de oxígeno la producción de energía vía fermentación es activada (Mathews, 2002). Este mecanismo lleva a la producción de menor cantidad de ATP y con esto a la disminución de múltiples funciones vitales, incluida en esta la división celular. Este es otro factor a considerar, en este caso, para explicar por qué los patógenos no lograron crecimiento con un 50% de la bebida carbonatada.

Los miembros del género *Salmonella*, están inhabilitadas para usar sacarosa y maltosa como fuente de energía. *E. coli* por otro lado puede usar ambos, la maltosa en mayor proporción (Garrity col, 2004). Independientemente de los factores que pueden influir en la sobrevivencia de estos patógenos en la bebida, se debe destacar que la potencialidad de estos patógenos para caer en el producto es muy poco probable. De hecho son contaminantes poco frecuentes en productos como bebidas carbonatadas ácidas. Esto último debido a que la producción de estas bebidas está por lo general asociada al uso de métodos de inocuidad como la pasteurización. Los tres patógenos son conocidos por ser termosensibles (Garrity y col, 2004) por lo que no podrían sobrevivir a los leves tratamientos de pasteurización usados en la industria de bebidas carbonatadas (Jay, 2005).

Los brotes de estos microorganismos reportados en jugos tienen una característica en común y es que se dan en jugos que justamente no han sido sometidos a procesos de pasteurización (McLellan y Splittstoesser, 1996; Vasada y Foster, 2003; Parish, 1998), manteniéndose en el producto por su ya estudiada resistencia a los bajos pH de los mismos (Foster y Vasada, 2003). Así, miembros del género *Escherichia*, *Salmonella* y *Listeria*, en general son microorganismos de poca preocupación en alimentos sometidos a tratamientos térmicos (Jay, 2005).

Las levaduras, y las BAL mostraron encontrar en la bebida un medio óptimo para su prevalencia, adaptándose a las características de la misma sin mayores inconvenientes; además los miembros del género *Clostridium* y su capacidad de formar esporas lo que los dotaría de la capacidad de mantenerse latentes en el producto; correspondería a aquellos microorganismo que pudiesen significar riesgos para la bebida por lo que se evaluara su comportamiento en un periodo de tiempo mayor para de esta forma establecer cuáles deben ser considerados riesgosos durante la preparación de la bebida.

5.2 Retos microbianos

Las bebidas carbonatadas son generalmente menos propensas al deterioro microbiano que las no carbonatadas (Back 2005), debido a que la carbonatación puede entre otros factores, inhibir el crecimiento de microorganismos mediante la inhibición de la división celular (Lumsden et al., 1987), la inhibición de la captación de aminoácidos (Knatchbull y Slaughter 1987), la perturbación del buffer citoplasmático, la inducción de la esporulación (Ohkuni et al.1998), disrupción de membrana (Dixon y Kell 1989), y la disminución del pH citoplásmico (Stratford 2006). Esto último debido a que el dióxido de carbono (CO₂) atraviesa rápidamente por difusión, lo que lleva a que las concentraciones a través de la membrana alcancen valores similares (Thomas 1995), llevando a que el pH interno sea similar al externo.

Los retos microbianos constituyen una útil herramienta en el estudio de la capacidad de un alimento para soportar el crecimiento de organismos deteriorantes o patógenos. Esta metodología es muy útil para productos alimenticios que pueden sostener el crecimiento de organismos patógenos y que se almacenan bajo refrigeración, temperatura elevada o temperatura ambiente y son vulnerables al crecimiento de microorganismos; permitiendo de esta forma estimar la potencial vida útil de ciertos alimentos refrigerados o almacenados.

Iniciando con un nivel de inóculo bajo, (figura 6) se produce un acelerado crecimiento de las cepas *Candida guilliermondii*, *Candida peliculosa*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces pastorianus* y *Rhodotorula mucilaginosa*; obteniéndose un aumento de hasta 7 unidades logarítmicas en un corto periodo de tiempo. Por otro lado las cepas de *Rhodotorula rubra* no alcanzaron valores tan altos, partiendo del mismo nivel de inóculo, la figura 6 muestra que en el caso de *Rhodotorula rubra* aislada, en el mismo tiempo (15 días) no se alcanzan niveles que signifiquen un daño para el

producto aunque la curva pareciera proyectar que en el tiempo pudiese aumentar la densidad poblacional y en el caso de la *Rhodotorula rubra* de cepario se obtuvo que la misma decae en el tiempo.

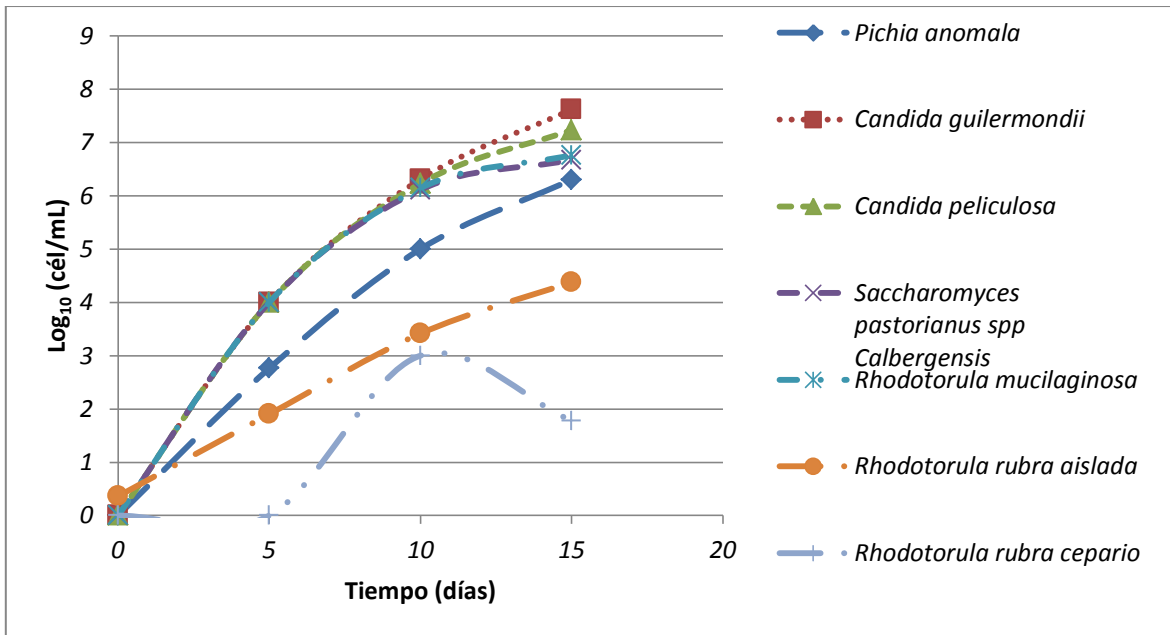


Figura 6. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1 cél/mL.

Para las cepas que lograron crecer con el inoculo más bajo (1cél/mL) y además mostraron resistir tratamientos de temperaturas (resultados mostrados más adelante), se repitió esta metodología pero partiendo de poblaciones de 0,1 (anexos, figura 22) y 0,01 cél/mL. La figura 7 muestra los resultados para el último caso donde se observa un resultado equivalente al encontrado para un inoculo de 1 cél/mL (figura 6).

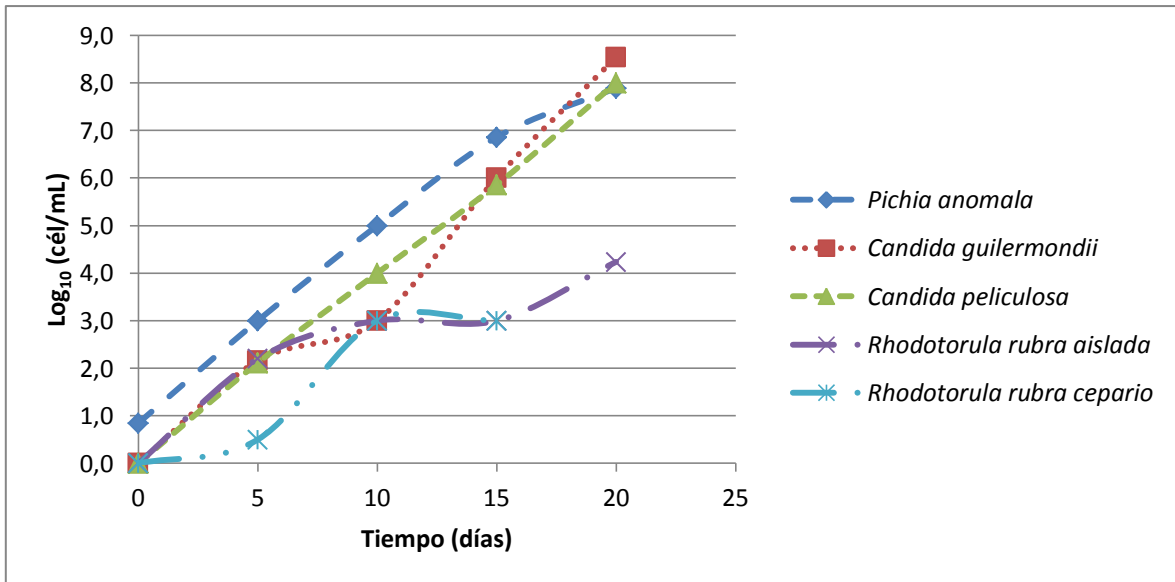


Figura 7. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,01 cél/mL.

Partiendo de un población inicial de 10 cél/mL (figura 8), los resultados mostraron que *Rhodotorula rubra* aislada alcanzó niveles que significan daño en la bebida; mientras que la de cepario no lo hizo. Sin embargo, partiendo de un inóculo de 100 cél/mL (figura 9) ambas cepas de *Rhodotorula rubra*, alcanzan una densidad poblacional que involucran daños en las propiedades organolépticas de la bebida.

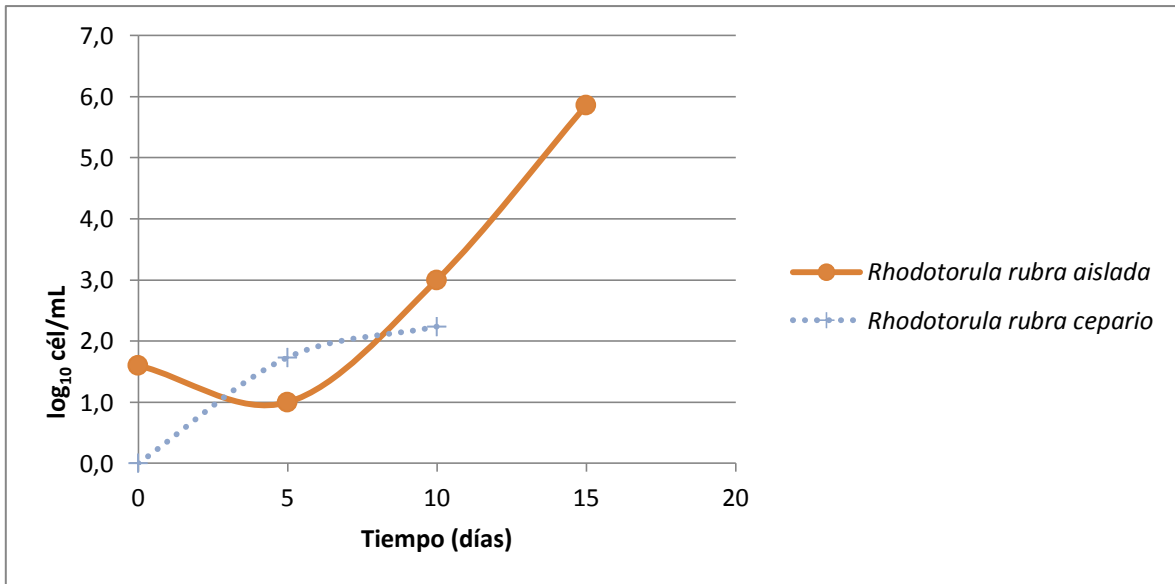


Figura 8. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 10 células/mL.

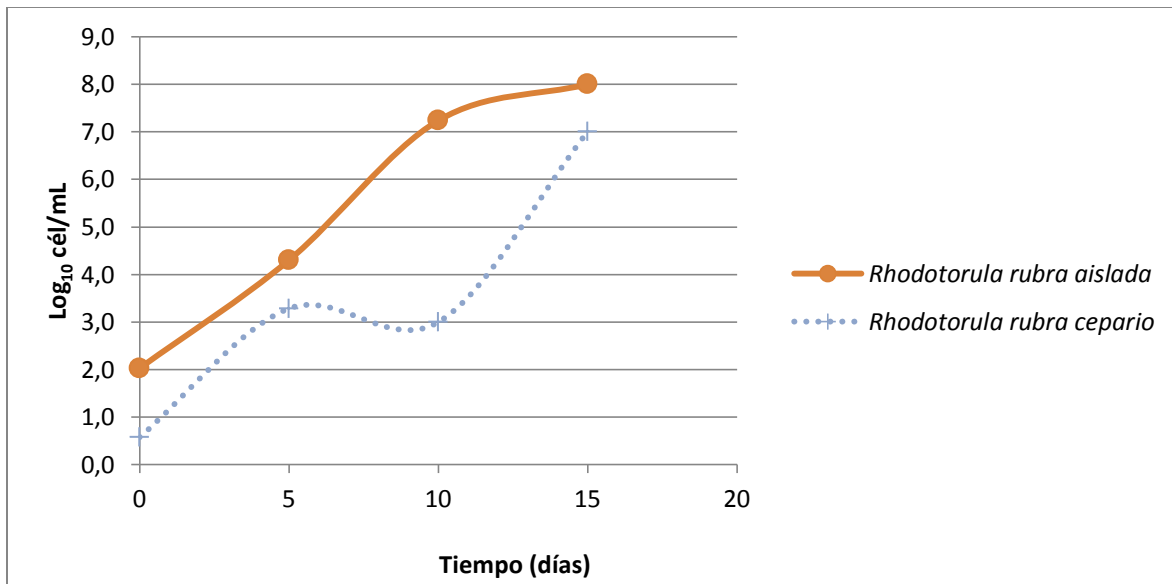


Figura 9. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 100 células/mL.

Los alimentos con frecuencia contienen levaduras, a bajo nivel sin un deterioro perceptible. La actividad metabólica de levaduras a una concentración celular de hasta 10.000 células/mL es insuficiente para generar diferencias apreciables en el alimento. Dado que para que existan cambios

organolépticos perceptibles se requieren concentraciones mayores que éstas, de 10^5 y 10^6 cél /mL (Ingram ,1949), es poco probable la contaminación a estos niveles por lo que la descomposición de un alimento por levaduras requiere el crecimiento de las mismas en la matriz (Querol y Fleet, 2006).

Las levaduras generalmente crecen bien en entornos cálidos, húmedos, azucarados, ácidos y aeróbicos (Querol y Fleet, 2006), algunas de estas propiedades están presentes en las bebidas a base de malta, sin embargo; la misma contiene ciertos atributos que pueden mermar la presencia de distintos microorganismos, estos comprenden el pH, la presencia/ausencia de algunos nutrientes y el dióxido de carbono que en refrescos carbonatados lleva a que los niveles de oxígeno sean generalmente muy bajos; es este último factor uno de los principales en la prevención del deterioro microbiano (Stratford 2006).

En empaques impermeables al oxígeno, los principales microorganismos de deterioro son las bacterias ácido lácticas (BAL) y las levaduras. La permeabilidad al oxígeno de los plásticos y otros materiales de embalaje varía mucho. El contenido de oxígeno en las botellas de politereftalato de etileno (PET) aumenta con el tiempo, mientras que las botellas de vidrio son impermeables al oxígeno (Stratford, 2006). Por lo tanto, las especies que son más propensas a estropear el producto en botellas de PET son diferentes de las que estropean el producto en botellas de vidrio (Juvonen, 2011).

Otro de los efectos del dióxido de carbono es la disminución de la disponibilidad del oxígeno, generando un ambiente anaeróbico que no todos los organismo son capaces de soportar. Frecuentemente se asume que la baja concentración de oxígeno es responsable de los efectos antimicrobianos del CO_2 descritos anteriormente. La realidad es que se presentan dos efectos separados. Si el CO_2 se disuelve en una bebida, no desplaza el oxígeno que ya está allí disponible,

esto sólo ocurrirá si se bombea CO₂ a través de una bebida durante un tiempo considerable; el CO₂ siendo un gas pesado, formará una capa por encima de la superficie de la bebida; debido a que el oxígeno en solución está en equilibrio con el gas en el espacio de cabeza, habrá, en este caso, una pérdida progresiva de oxígeno de la bebida (Querol y Fleet, 2006).

Es conocida la importancia del oxígeno para la respiración, como aceptor final de electrones de la cadena de transporte mitocondrial. Éste es necesario en grandes cantidades, y en una levadura que respira, este proceso puede ser directamente proporcional a la concentración de oxígeno presente en el medio (Johnson 1967).

Las especies de levaduras capaces de usar la vía fermentativa (anaerobiosis), presentan una clara ventaja en un entorno con bajo contenido de oxígeno. Sin embargo, incluso las levaduras que fermentan pueden requerir oxígeno para propósitos diferentes a la respiración. El oxígeno puede ser requerido en algunas especies de levadura para la absorción de azúcar activa, el efecto Kluver (Barnett y Sims, 1982). Se ha demostrado que las levaduras de fermentación cervecera se benefician de la aireación (Grutzmacher, 1991). Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* requiere concentraciones bajas de oxígeno para sintetizar ácidos grasos insaturados y esteroides como componentes de la membrana. En ausencia completa de oxígeno, el crecimiento de *S. cerevisiae* cesa a menos que se añadan ácidos grasos insaturados exógenos y esteroides (Andreasen y Stier, 1953, 1954; Querol y Fleet, 2006).

Las levaduras se pueden clasificar en base al modo en el que metabolizan los carbohidratos en presencia/ausencia de oxígeno. Los aerobios obligatorios hacen uso exclusivo de las vías respiratorias y no pueden fermentar los azúcares; se incluyen en este grupo los géneros, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* y *Saccharomycopsis* (Briggs y col, 2004).

Considerando la metodología llevada a cabo, se esperaba que los niveles de carbonatación a lo largo del ensayo fueran altos, y en consiguiente hubiese en principio un ambiente anaeróbico, lo que en consecuencia mermaría en el crecimiento de cepas netamente aeróbicas como las pertenecientes al género *Rhodotorula*. Esto puede ser evidenciado en los resultados, en los que se halló que para el caso de las *Rhodotorula rubras* ensayadas, a bajos niveles de inóculo, el crecimiento no alcanzó niveles que significasen un daño al producto (figuras 6 y 7).

Por otro lado con una mayor población inicial, el crecimiento puede explicarse en el hecho de existe una mayor cantidad de microorganismos y con estos mayor posibilidad de aprovechar el poco oxígeno presente y en consiguiente se produzca el aumento poblacional. Otra explicación para el crecimiento de esta cepa aerobia obligada, es la forma en la que se llevó a cabo el ensayo. Aunque se buscaba mantener lo más posible la carbonatación dentro de los viales con las bebidas y los microorganismos, dicha tarea se dificultaba con el hecho de que la temperatura disminuye la solubilidad del dióxido de carbono (CO₂) (Daniels y col, 1984), por lo que era difícil mantener los niveles iniciales de carbonatación constante a lo largo de todo el ensayo, considerando la incubación a 28°C. Así, de esta forma el ambiente anaerobio no fue tal y había oxígeno en el medio que permitió el crecimiento de esta cepa; esto hace a esta cepa de especial cuidado en los envases PET donde los niveles de oxígenos aumentan paulatinamente.

Los anaerobios facultativos por otro lado, pueden utilizar vías respiratorias y fermentativas. Este grupo se subdivide además en función de la proporción de azúcares catabolizados por cada ruta bajo condiciones aeróbicas. Los tipos respiratorios eliminan el 70% o más de los azúcares a través de la respiración (el resto por fermentación), éstos incluyen *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* y *Pichia*; algunos de estos usados para este estudio mostraron una alta prevalencia en el producto

debido justamente a la capacidad de metabolizar los azúcares de la bebida en un ambiente con bajos o altos niveles de oxígeno (Briggs y col, 2004)

Las levaduras fermentativas como *Saccharomyces*, por su parte se caracterizan por altas tasas de metabolismo del azúcar, de las cuales el 10% o menos se cataboliza por la respiración. (Briggs y col, 2004); lo que explicaría la alta prevalencia de esta cepa en la bebida, incluso si los niveles de oxígeno eran altos.

Cuando se presentan con una mezcla de azúcares asimilables, las levaduras tienen mecanismos para seleccionar primero, los que son más fácilmente utilizados. La figura 10 muestra el uso de distintos azúcares en el tiempo, observándose que la glucosa es el principal carbohidrato a utilizar, en comparación con sacarosa y fructosa; como se observa la presencia de maltosa también representa un sustrato para estos microorganismos (Querol y Fleet, 2006).

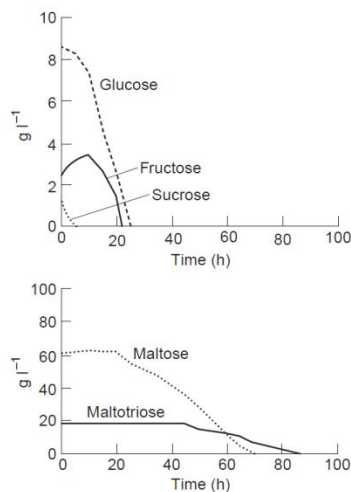


Figura 10: Uso de diferentes azúcares por las levaduras.

La asimilación de sacarosa por parte de las levaduras es dependiente de una enzima constitutiva conocida como invertasa, ésta se secreta en el periplasma y es responsable de la asimilación de sacarosa extracelular. Una vez incorporada a la célula, la sacarosa es hidrolizada y se secreta en el

periplasma, resultando en un aumento transitorio en las concentraciones de fructosa y glucosa; ambas asimiladas simultáneamente.

La presencia de nitrógeno asimilable (aminoácidos), minerales, vitaminas, junto con menores factores de crecimiento (Querol y Fleet, 2006); además de presentar una gama de carbohidratos altamente catabolizables por estos microorganismos, convierte a la bebida en un medio propicio para el crecimiento de estos organismos. La sacarosa presente en grandes cantidades en la bebida es primariamente asimilada, su conversión en fructosa y glucosa permiten el aumento en biomasa, la presencia de otros azúcares como maltosa y maltotriosa, las cuales se usan en última instancia también aseguran el aumento en la densidad poblacional, tal como se observó en los experimentos realizados.

Al inicio de estos retos microbianos se esperaba el uso de un metabolismo fermentativo por la ausencia de oxígeno en el medio, seguido luego de una ruta respiratoria porque ya existiría oxígeno en los viales. El rápido aumento de biomasa pudiese sugerir por un lado, que el metabolismo fermentativo aunque genera menor cantidad de energía, (2 ATP) es suficiente para producir el aumento de biomasa observado en las figuras 6, 7, 8, 9; por otro lado la probabilidad de salida del CO₂ de los viales pudiese significar un medio aeróbico que lograra traducirse en un aumento de biomasa para todas las cepas de levadura, incluidas las aerobias estrictas como *Rhodotorula*.

Rhodotorula rubra aislada y de cepario, no alcanzaron el elevado crecimiento en comparación al resto de las levaduras. Para niveles de inóculo de 1; 0,01 cél/mL (figuras 6,7) no alcanzaron niveles que provocan daño; sin embargo para el resto de los ensayos llegaron a niveles de deterioro del producto. Un resultado incongruente, si se compara con el inóculo de 1 cél/mL; es el obtenido para un inóculo de 0,1 cél/mL (figura 22, anexo) donde, la *Rhodotorula rubra* aislada alcanzó niveles que

implican deterioro. Se sugiere entonces que los niveles de oxígeno en el medio eran mayores en este caso que en el resto, y con esto se permitió el crecimiento de esta cepa.

Se reconocen dos clases de portador de hexosa, clasificados en términos de alta y baja afinidad. Los sistemas de alta afinidad transportan D-glucosa, D-fructosa y D-manosa y son de la variedad de difusión facilitada, estos tienen valores de K_m de aproximadamente 1 mM. En presencia de concentraciones relativamente altas de glucosa ($> 0,1$ M) se reprime la actividad (Does y Bisson, 1989). Este fenómeno forma parte de un sistema de control metabólico más amplio, denominado represión catabólica, que previene el gasto de energía en sistemas enzimáticos que no se utilizan, el mismo; previene la expresión de genes que producen proteínas necesarias para la fermentación de otros numerosos catabolitos como la lactosa, arabinosa y galactosa, aun cuando están en concentraciones elevadas (Briggs y col, 2004).

Durante mucho tiempo se ha sostenido que en *S. cerevisiae* el flujo de piruvato a las ramas fermentativa y oxidativa es una función principalmente de las propiedades cinéticas de piruvato deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa. La piruvato deshidrogenasa (ciclo ácido cítrico) tiene una afinidad diez veces mayor por el piruvato que la piruvato descarboxilasa (en condiciones anaerobias, esta enzima es parte del proceso de fermentación que produce etanol y que se produce en las levaduras), pero su actividad en la célula es bastante baja. Por lo tanto, las bajas concentraciones de piruvato favorecen su oxidación a través de piruvato deshidrogenasa, mientras que las altas concentraciones de piruvato (que ocurren cuando el flujo a través de la glucólisis es alto, como durante el crecimiento a altas concentraciones de glucosa) resultan en el metabolismo fermentativo a través de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa con la formación resultante de etanol; (Querol y Fleet, 2004).

Esta represión catabólica es conocida también como el efecto Crabtree y se refiere a la ocurrencia de la fermentación alcohólica (en lugar de la respiración) de la glucosa en condiciones aeróbicas. Esta es una característica de *S. cerevisiae* y algunas otras levaduras fermentadoras facultativas (Briggs y col, 2004).

En levaduras Crabtree-positiva como *S. cerevisiae* la glucólisis se convierte en la principal vía de producción de energía y se produce etanol. La expresión de varios conjuntos de genes están reprimidos lo que conlleva en que distintas enzimas se vean inactivadas y en consecuencia distintos procesos como la vía respiratoria (mediado por la citocromo oxidasa), el ciclo de ácido tricarboxílicos (citrato sintasa), gluconeogenesis, entre otros se vean inactivados (Briggs y col, 2004).

Ahora si se considera el metabolismo Crabtree se esperaría crecimiento independientemente de los niveles de oxígeno al inicio para aquellas cepas que presenten esta característica. Además podría sugerirse que las curvas obtenidas donde se denota el aumento de varias unidades logarítmicas, se deben a que la baja tasa de producción de ATP es suficiente para el crecimiento de las levaduras que presenten este metabolismo.

Adicionalmente, las levaduras son conocidas por ser microorganismos responsables del deterioro en alimentos con bajo pH y alto contenido de azúcares (Deak, 1991). La mayoría de las levaduras son ligeramente acidófilas, pudiendo crecer bien entre pH 4.5 y 6.5, con varias especies que son capaces de crecer en condiciones más ácidas o alcalinas. Durante las fermentaciones alcohólicas (que pueden darse en ausencia o presencia de oxígeno, dependiendo de la especie), el pH disminuye debido a una serie de factores como la disolución de CO₂, la extrusión de protones y la secreción de ácidos orgánicos (Querol y Fleet, 2006). Esta genera una intrínseca resistencia a los bajos pH que permite a estos microorganismos no sólo su permanencia en el producto sino además el crecimiento en el mismo.

Una posibilidad que explica la capacidad de las levaduras para tolerar bajos niveles de pH se relaciona con un aumento en la actividad de la ATPasa, que regula el pH intracelular por salida de protones durante el crecimiento en medio ácido (Eraso y Gancedo, 1987). Tomando esto en cuenta, se explica el crecimiento de las levaduras probadas en la bebida, cuyo pH está cercano a 4.5 (Briggs y col, 2004).

Similar al caso de las levaduras, encontramos el de las bacterias ácido lácticas (BAL). La bebida ofrece para estos microorganismos un medio de crecimiento óptimo, pues contiene todos los nutrientes necesarios para el aumento poblacional; ni el pH de la bebida ni la presencia de CO₂, representa una barrera contra el crecimiento de estas bacterias, permitiéndole sus características fisiológicas la capacidad de crecer en el producto. Estos microorganismos son los más comunes encontrados en las bebidas carbonatadas, debido justamente a su habilidad de crecer en ambientes ácidos y limitadas concentraciones de oxígeno (Juvonen y col, 2011).

Partiendo de niveles de inóculo de 1 cél/mL, la figura 11 muestra el rápido crecimiento observado para las dos cepas de *Lactobacillus* utilizadas, comportamiento similar al observado para las levaduras anaerobias facultativas. Considerando la capacidad de las BAL de crecer en ambientes anaeróbicos vía ruta fermentativa, se esperaba su prevalencia y aumento poblacional en la bebida. Con niveles de inóculos menores (figuras 23,24; anexos) y mayores (figuras 25,26; anexos) se obtuvieron resultados equivalentes.

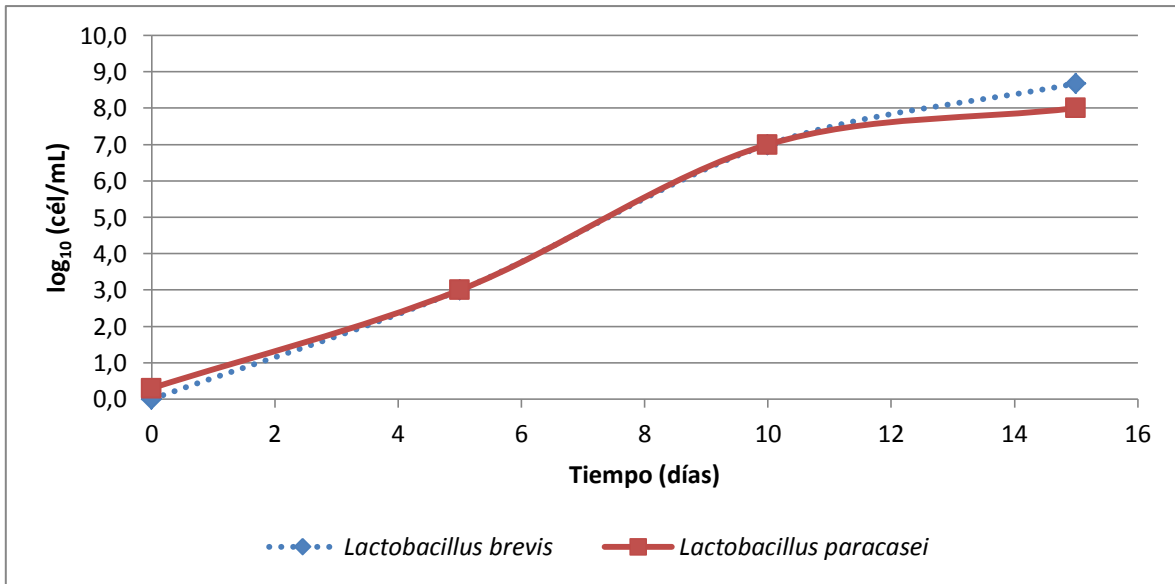


Figura 11. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1 célula/mL.

Los productos finales de la fermentación, tales como ácidos orgánicos o alcoholes, ejercen sus efectos deletéreos provocando una acidificación del citoplasma por debajo del pH permisible. Cuando esto ocurre, las funciones celulares son inhibidas (Kashket, 1987), por desnaturalización de proteínas y consecuente pérdida de función enzimática y estabilidad del ADN (Mattews, 2002). Los ácidos orgánicos, que actúan como protonóforos, o disolventes, que perturban los fosfolípidos de la membrana, a altas concentraciones aumentan la fuga hacia el interior de H⁺ de modo que el flujo hacia el exterior de H⁺ no es lo suficientemente rápido como para alcalinizar el citoplasma. (Kashket, 1987).

Es conocido que las bacterias establecen y mantienen un gradiente electroquímico de protones, por lo general alcalino en el interior y negativo a través de la membrana citoplasmática (Harold, 1972). El gradiente de protones es interconvertible con ATP mediante la ATPasa de traslocación de H⁺ (ATP sintasa, B_FoF₁). Estas dos formas de energía metabólica son las principales fuerzas motrices para

las reacciones celulares, que actúan directamente o mediante gradientes de iones secundarios o compuestos de alta energía. El gradiente de pH así se disipa (Kashket, 1987).

El pH interno es el pH relevante para la mayor parte de la maquinaria enzimática de la célula. Mantener ese pH parece ser el papel principal de la bomba H^+ -ATPasa, al menos para los estreptococos (Kobayashi, 1985)

La mayoría de los estudios sobre la homeostasis del pH (mantenimiento de un pH interno constante) se han ocupado de los Gram-negativos entéricos. Se ha documentado bien que estos anaerobios facultativos mantienen un pH interno constante de 7,6-7,8 en las condiciones de pH medio de crecimiento y metabolismo (Booth, 1985;). El mantenimiento del pH interno parece implicar la regulación de los sistemas de transporte de iones acoplados a H^+ (Brink y col, 1986).

Sin embargo, muchas bacterias no mantienen un pH interno constante. En *Clostridium* (Baronofsky y col, 1985; Riebeling y col. 1975; Huang y col, 1985), muchos estreptococos (Kashket y col, 1985) y *Lactobacillus* a medida que el pH disminuye debido a la acumulación de productos finales de fermentación ácida, el pH interno también disminuye, aunque permanece más alcalino que el pH externo; es decir, las células mantienen un pH alcalino en el interior. Así, a diferencia de muchos aerobios (Cobley y Cox, 1983), los fermentadores anaeróbicos toleran las variaciones bastante amplias en la concentración interna de protones (Kashket, 1987).

Kobayashi y colaboradores sugieren en sus estudios que la H^+ -ATPasa regula el pH interno en células de *Streptococcus faecalis*. (Kobayashi y col., 1982). Un factor que interviene en el control del pH es la dependencia del pH de la H^+ -ATPasa, cuyo pH óptimo está entre 6 y 8, con disminuciones pronunciadas en la actividad por debajo y por encima de estos valores.

Por lo tanto, si el citoplasma excede el pH de 8, el bombeo de protones disminuye, y se produce menos alcalinización del citoplasma. Cuando el pH interno disminuye por debajo de 8, se estimula el bombeo de protones, y el pH interno se eleva como resultado. La importancia de la H⁺-ATPasa en el control del pH también se muestra por el aislamiento de mutantes que crecen bien a pH 7,5, pero no pueden crecer a pH 6. Los mutantes aparentemente son defectuosos en el sistema regulador de pH, ya que no pueden mantener una normal diferencia de pH (Kobayashi y Unemoto, 1980). Las membranas de las células mutantes son normalmente permeables a los protones, pero muestran una actividad ATPasa deficiente.

Lo previamente planteado sugiere entonces como muchos microorganismos pueden mantener un pH interno que mantenga las normales funciones metabólicas y con estos puedan mantener un sostenido crecimiento en alimentos de baja acidez. En el caso de los *Lactobacillus*, explicaría el pronunciado crecimiento en la bebida a base de malta (pH cercano a 4), que se observa en la figura 9, a cualquier nivel de inóculo inicial, lo que los convierte en microorganismos primarios de deterioro en este tipo de alimentos.

Durante la fermentación láctica el pH en el medio desciende hasta un punto en el que muchas de las bacterias ácido lácticas ven inhibido su crecimiento (Juvonen y col, 2011), sin embargo los *Lactobacillus* que pueden crecer en medios con pH cercanos a 4 (Madigan y col, 2003), siendo entonces capaces de resistir el pH de diversos alimentos.

Es bastante aceptado que el deterioro por las BAL es común en los productos ácidos, tales como zumos de frutas, productos cítricos, jugo de tomate y conservas de vinagre. El crecimiento de las BAL en jugos de fruta y tomate es favorecido por altos contenidos de ácido y azúcar y por algunos factores estimuladores adicionales presentes (Amachi, 1975; Yoshizumi, 1975). El bajo pH de los

zumos de frutas entre 3,0 y 3,7 y el alto contenido de azúcar (50-150 g de azúcares fermentables glucosa, fructosa y sacarosa por litro, aunque generalmente un contenido de proteínas <1%) (Jay y col., 2005) permite el crecimiento de algunos lactobacilos y leuconostocs, especialmente en los zumos de naranja y de manzana "moderadamente" ácida, con rangos de pH de alrededor de 3,3 a 4,5. Se ha descrito el deterioro de *Lactobacillus brevis* en productos cítricos con un pH inferior a 3,5 (Juven, 1976).

Se han encontrado reportes en los que *Lactobacillus paracasei* fue aislado de limonada, bebida con un pH menor a 4.5 generando ácido láctico, diacetilo y dióxido de carbono como producto final. Esto denota la capacidad de este microorganismo para crecer en medios con pH similares a la bebida a base de malta (Back y col., 1999).

Las BAL como organismos de fermentación, carecen de sistemas de transporte de electrones heme-ligados funcionales o citocromos, y obtienen su energía por fosforilación a nivel de sustrato mientras oxidan carbohidrato (Jay, 2005).

Con base a los productos finales del metabolismo de la glucosa las BAL se dividen en dos grupos: homolácticas y heterolácticas. Las que siguen un patrón homofermentativo producen ácido láctico como único producto final, usando la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen las enzimas: hexoisoimerasa que cataliza la conversión de glucosa 6 fosfato en fructosa 6 fosfato (Voet y col, 2007); y la aldolasa, que cataliza la división de la fructosa 1,6-bisfosfato en dos fracciones de fosfato triosa que se convierten adicionalmente en lactato (Voet y col, 2007).

Por otro lado las que producen cantidades equimolares de ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido fórmico, succinato y dióxido de carbono a partir de glucosa son las pertenecientes al grupo de las

heterofermentativas; estas poseen la enzima fosfoacetolasa pero no aldolasa ni hexoisomerasa, por lo que en lugar de degradar la glucosa por la vía EMP, usan como alternativa la vía de las pentosas o monofosfato de hexosa (Leveau y Boix, 2000).

Las homolácticas son capaces de extraer aproximadamente el doble de energía de una cantidad dada de glucosa que las heterolácticas (Jay, 2005). De acuerdo a esto, se esperaba que la cepa homofermentativa (*Lactobacillus brevis*), utilizada en este estudio, presentase un crecimiento mucho más acelerado que la heterofermentativa (*Lactobacillus paracasei*) empleada. No obstante, los resultados exponen que ambas cepas aumentaron los niveles poblacionales en la misma velocidad. Los azúcares presentes en la bebida ofrecen un sustrato óptimo para la producción de energía por parte de los *Lactobacillus*, su metabolismo meramente fermentativo ofrece una vía de crecimiento en ausencia de oxígeno (Madigan y col, 2003).

Tomando en cuenta las condiciones del ensayo, donde era de esperarse que la concentración de dióxido de carbono y con esto el ambiente anaeróbico, fuera disminuyendo con el tiempo; el carácter aerotolerante de este tipo de microorganismos (Kandler, 1983), permitió que se mantuviera el crecimiento de estos a pesar del ambiente aeróbico. La baja cantidad de oxígeno al inicio del experimento representaba un ambiente anaeróbico que impulsaba el crecimiento. El hecho de que la concentración siguiera aumentando en el tiempo evidencia un carácter anaerobio facultativo distintivo de estos microorganismos (Jay, 2005).

Por otro lado, las bacterias formadoras de esporas son un grupo diverso de microorganismos y algunos de ellos causan un importante deterioro de los alimentos. Estos organismos están comúnmente asociados con el deterioro de los alimentos tratados con calor debido a la capacidad de

las esporas para sobrevivir a las altas temperaturas comúnmente usadas para conservar los alimentos (Blackburn, 2006).

La figura 12 muestra que en la bebida ninguna de las especies del género *Clostridium* utilizados mostró crecimiento en el tiempo. Considerando que con estos microorganismos no se alcanzó una adaptación al 100% de la bebida, se presumía que los mismos no mostrarían crecimiento en esta matriz.

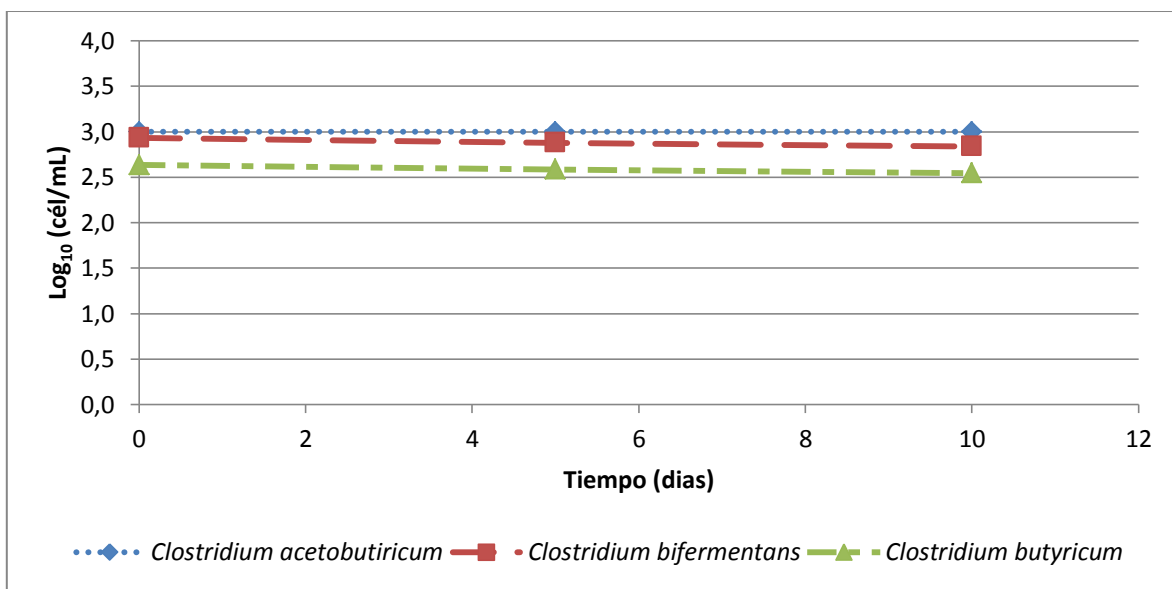


Figura 12. Comportamiento de los *Clostridium* en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1000 células/mL.

Los *Clostridium* muestran rangos de crecimiento óptimos a pH entre 6-7; fuera de éste, forman esporas que permiten la prevalencia de los mismos en el tiempo (Blackburn, 2006). Las tres especies probadas (*Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*) mostraron incluso crecimiento en caldo de cultivo con un pH de 4.5-5, tal como los señala (De Vos, 2009). Además de ser capaces de utilizar maltosa y sacarosa como azúcares fermentables. Esto último implica que la fuente de carbono presente en la bebida no representa un problema como

fuerza de energía. Sin embargo, con valores de pH menores el crecimiento se ve inhibido y se da la formación de la estructura de resistencia antes mencionada.

El bajo pH del producto implicó un pobre o ningún crecimiento por parte de estas tres especies, y tomando en cuenta la capacidad de sobrevivir en ambientes de estrés, se infiere que la acidez del medio estimuló la formación de esta estructura de resistencia, dotándolos de la capacidad de mantenerse en el producto, sin producirse ningún crecimiento como lo muestra la figura 12, en la que es perceptible que los niveles poblacionales se mantienen constantes en el tiempo, para una concentración inicial de 1000 cél/mL.

Este grupo de bacterias conocidos por su capacidad de producir esporas, que se caracteriza por una etapa de reposo que las células no dividen tienen poco o ningún metabolismo lo que les permite permanecer latentes durante periodos de tiempo extremadamente largos (Blackburn, 2006); esta estructura de resistencia permite su prevalencia en medios cuyas condiciones no son óptimas para el crecimiento de la forma vegetativa (Nicholson y col, 2000), de esta manera se mantienen en un estado latente hasta que las condiciones sean óptimas, donde las mismas germinan e inician su crecimiento (Hansel y col, 1970).

En estado latente, las esporas no experimentan ningún metabolismo detectable y exhiben un mayor grado de resistencia a la inactivación por diversos insultos físicos, incluyendo (pero no limitado a) calor húmedo y seco, radiación UV y gamma, desecación extrema (incluyendo vacío) y agentes oxidantes. Sin embargo, a pesar de su inactividad metabólica, las esporas siguen siendo capaces de monitorear continuamente el estado nutricional de su entorno y responden rápidamente a la presencia de nutrientes apropiados al germinar y reanudar el crecimiento vegetativo. Por lo tanto, la formación de esporas representa una estrategia mediante la cual la célula bacteriana escapa

temporalmente de condiciones locales nutricionalmente desfavorables a través de la latencia (Nicholson y col, 2000).

Las bacterias formadoras de esporas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* son usualmente inhibidas en refrescos debido al bajo pH. Sin embargo, las esporas pueden permanecer viables en estos productos. Las especies de *Bacillus* y *Clostridium* son organismos típicos de deterioro en jugos vegetales menos ácidos, que presenta un pH por encima de 4. (Back 2005, Tribst y col., 2009).

Los clostridios anaeróbicos formadores de butirato tales como *Clostridium butyricum* pueden estropear los jarabes de azúcar utilizados en la industria de bebidas durante la fabricación o el almacenamiento del jarabe. Estas bacterias pueden estar activas incluso a valores de pH de 3,6 - 3,8 (Hawthorne et al., 1991, Stenius et al., 1991), valor cercano al pH del producto; sin embargo para esta cepa los datos no arrojaron resultados que mostraran crecimiento del mismo.

Clostridium butyricum que pareciese ser el más resistente a bajos pH de los tres probados es responsable de la descomposición del queso, la leche condensada y los alimentos enlatados ácidos (pH \leq 4.6), en particular los tomates y otras frutas (por ejemplo, jugos de pera y de albaricoque y piña en conserva), junto con *Clostridium pasteurianum* (Spiegelberg, 1936, Ikegami y col., 1970, Hernández y Feria, 1971). Estos organismos pueden iniciar el crecimiento a valores de pH bajos (hasta 3,6). *Clostridium butyricum* es una especie común encontrada en la leche. Como sugiere su nombre, produce ácido butírico, es fuertemente sacarolítico y no es proteolítico. El organismo también se ha asociado con el deterioro de los vinos, dando lugar a un aspecto rancio debido a la producción de ácido butírico (Blackburn, 2006).

Tomando en cuenta la alta prevalencia de las levaduras, BAL y *Clostridium* que bajo la forma de esporas pueden soportar la características de la matriz; se debe considerar una vía alterna que

asegure la estabilidad microbiológica de la bebida; para lo cual se llevaran los microorganismos antes mencionados a ensayos de resistencia térmica en el que se evaluara su resistencia a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura, con el propósito de diseñar un procedimiento de pasteurización que asegure la estabilidad del producto.

5.3 Ensayos de resistencia térmica

Valores extremos de temperatura lleva a que propiedades de plegamiento de las proteínas se vean afectadas, lo que recae en la pérdida de los atributos biológicos de las mismas (Tortora, 2013). Uno de los efectos del calor sobre las células es la desnaturalización de proteínas que conlleva a la inhibición e inactivación de diferentes procesos celulares mediados por sistemas enzimáticos. La desnaturalización provoca un desplegamiento de las cadenas polipeptídicas al destruirse la estructura de orden superior de la molécula, el polipéptido mantiene su estructura primaria porque se mantienen por enlaces peptídicos covalentes. Así, la desnaturalización de proteínas es uno de los principales procesos por el que los microorganismos son destruidos (Madigan, 2003).

La tabla 3 resume las temperaturas de tratamientos y las correspondientes reducciones logarítmicas para cada uno de los microorganismos probados. En anexos pueden visualizarse además los resultados obtenidos para cada tratamiento aplicado a cada uno de los microorganismos.

Tabla 3. Número de unidades logarítmicas (UL) máximas reducidas para cada tratamiento térmico y su correspondiente tiempo de tratamiento usado, para cada uno de los microorganismos en el estudio.

Cepa	UL máxima reducidas T= 62°C (minutos)	UL máxima reducidas T= 65°C (minutos)	UL máxima reducidas T= 68°C (minutos)	UL máxima reducidas T= 70°C (minutos)	UL máxima reducidas T= 72°C (minutos)
<i>Rhodotorula rubra</i> aislada	3,1 (12)	3,2 (20)	3,6 (5)	4,4 (18)	6,4 (15)
<i>Rhodotorula rubra</i> cepario	3,7 (18)	3,7 (20)	5,8 (12)	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5,9 (12)	5,9 (9)	5,9 (7)	-	-
<i>Pichia anomala</i>	3,2 (18)	4 (7)	5 (20)	6,3 (15)	6,3 (20)
<i>Candida guilliermondi</i>	3,4 (20)	3,3 (20)	3,1 (20)	6,4 (12)	6,4 (12)
<i>Candida peliculosa</i>	2,9 (20)	3,2 (20)	3,6 (20)	6,1 (9)	6,1 (7)
<i>Sacharomyces pastorianus</i>	5,3 (18)	6 (12)	6 (9)	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	3 (20)	3,6 (20)	4 (18)	3,6 (15)	5,2 (20)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3,1 (20)	3,3 (20)	4,2 (20)	5 (12)	5,2 (20)
<i>Clostridium bifermentans</i>	3 (20)	3 (20)	5,1 (20)	-	-
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	4,6 (20)	5,8 (15)	5,8 (15)	-	-
<i>Clostridium butyricum</i>	3,4 (20)	4,7 (20)	5 (12)	-	-

Para considerar eficiente un determinado tratamiento térmico se requiere una reducción de 5 unidades logarítmicas, en el caso de las levaduras se encontró que *Sacharomyces pastorianus* resultó ser la cepa más termolábil requiriéndose sólo de 62°C para una reducción eficiente y como se presumía el tiempo necesario para dicha reducción fue menor con el aumento de temperatura (Figura 13, tabla 3). Para esta cepa y demás que no mostraron resistencia a 68°C no se llevaron a cabo ensayos con temperaturas mayores.

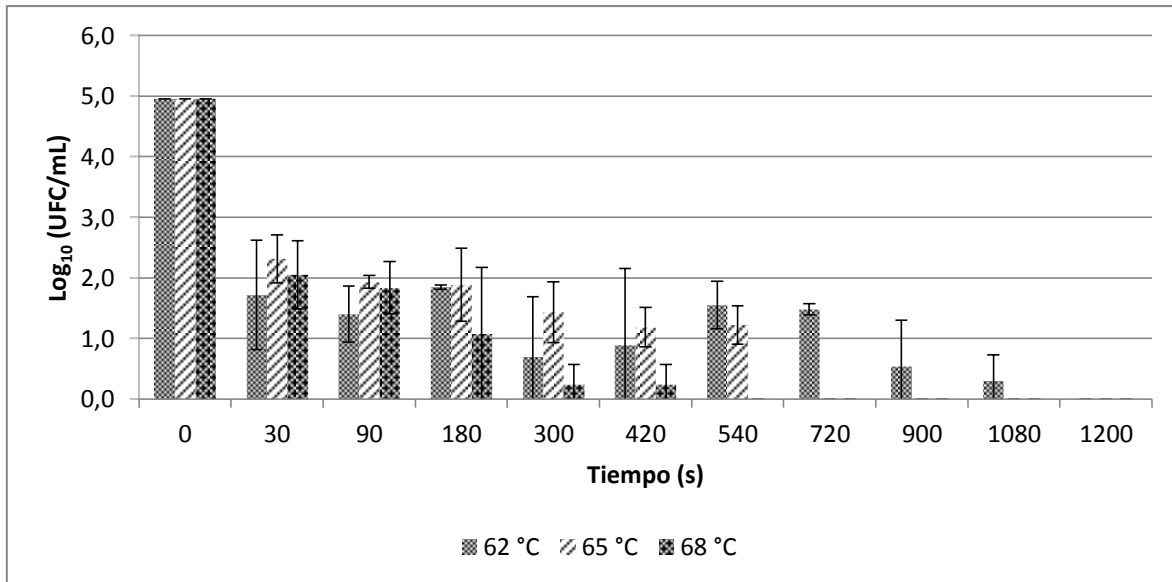


Figura 13. Resistencia de *Sacharomyces pastorianus*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

Rhodotorula mucilaginosa mostró también ser poco resistente a los tratamientos térmicos encontrándose que con un tratamiento de 62°C durante 12 minutos es suficiente para la disminución de 5UL (tabla 3); sin embargo para este caso se encontraron discrepancia en los resultados debido a que, como se observa en los mismos (figura 22, anexos), se recuperaron sobrevivientes con tratamientos a igual temperatura pero mayor tiempo (20 minutos por ejemplo), sin embargo esto puede deberse posiblemente a una falta de heterogeneidad del calor durante el tratamiento, a la diversidad dentro de la misma población o incluso a la probabilidad de captura de los microorganismos tomando en cuenta la falta de homogeneidad en la población.

Como se observa en la figura 14, la levadura que mostró mayor resistencia a las temperaturas evaluadas fue *Rhodotorula rubra* aislada de proceso, la cual requirió de hasta 72°C durante 15 minutos de tratamiento para una reducción eficiente.

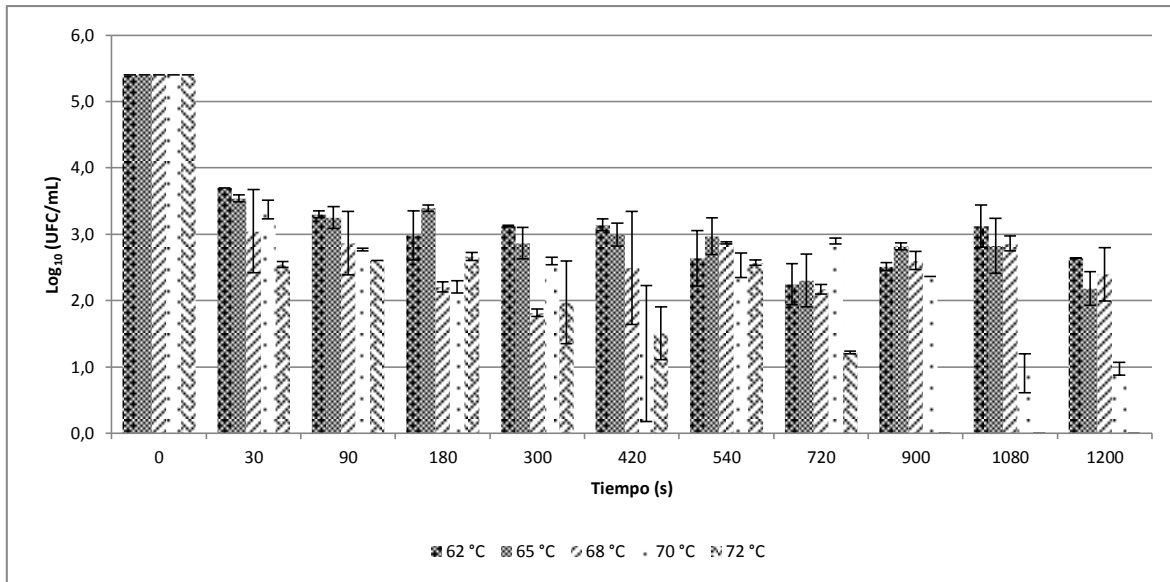


Figura 14. Resistencia de *Rhodotorula rubra* aislada, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

Considerando que esta cepa fue aislada a partir de procesos industriales de producción de bebidas, se esperaba presentase la mayor resistencia a los atributos que presenta la matriz y además a los diferentes tratamientos de calor, lo que la convirtió en el microorganismo blanco para el diseño del proceso de pasteurización. A diferencia de ésta, la misma cepa extraída de cepario, mostró ser mucho más termolábil encontrándose que un tratamiento de 68°C durante 12 minutos fue suficiente para una reducción de 5UL. Se evidenció así, una marcada diferencia del microorganismos en condiciones ideales (cepario) y cuando es sometida a procesos de estrés como la falta de nutrientes, la exposición a productos de limpieza, procesos de temperatura, entre otros.

Pichia anomala, requirió un tratamiento de 68°C durante 20 minutos para una reducción eficiente, tratamiento con temperaturas más altas lograron la reducción total de la carga microbiana inicial (6 UL). Finalmente, las especies ensayadas pertenecientes al género *Candida sp*, exhibieron resistir tratamientos de 68°C, aunque con tratamientos superiores se alcanzó una reducción mayor, de 5 UL

con tiempos de 12 minutos (70 Y 72°C) para *Candida guilliermondii*, y de 9 y 7 minutos a 70 y 72°C respectivamente, para *Candida pelliculosa*.

Debido a que está bien establecido que la desnaturalización de proteínas ocurre a un ritmo más rápido cuando se calienta en un medio líquido que en aire, se sugiere que la desnaturalización de las mismas es el mecanismo de muerte por calor o está estrechamente asociada con ella. La manera precisa en la que el agua facilita la desnaturalización por calor de las proteínas no está del todo clara, pero se ha señalado que el calentamiento de las proteínas húmedas provoca la formación de grupos sulfhidrilos (-SH) libres con el consiguiente aumento de la capacidad de unión a agua de las proteínas. La presencia de agua permite además la ruptura térmica de los enlaces peptídicos, un proceso que requiere más energía en ausencia de agua y, en consecuencia, confiere una mayor refractividad al calor (Jay, 2005).

Medios ácidos o alcalinos aumentan la desnaturalización térmica de las proteínas lo que conlleva a una disminución en la resistencia al calor de los microorganismos. En general los microorganismos son más resistentes al calor a su pH óptimo de crecimiento, habitualmente cercano a 7,0. (Cook y Gilbert, 1968). El aumento de la sensibilidad a la temperatura es posiblemente debido a un efecto combinado de la acción sobre las proteínas del tratamiento térmico y la acidez. Éste último pudiese generar por sí solo, cambios en la estructura de las proteínas, más en concreto al cambiar los estados de ionización de los aminoácidos presentes en las mismas y consecuentemente, el rompimiento de ciertas interacciones entre los grupos R de los aminoácidos que componen la proteína (Mattews, 2002).

La regla general es que, a medida que el pH disminuye o aumenta a partir del valor óptimo para cada microorganismo, existe un consiguiente aumento de la sensibilidad térmica (Stumbo, 1973); sin

embargo esto dependerá enteramente del medio en el cual se lleve a cabo el calentamiento. Así, además de la fisiología y genética de cada microorganismo, diferentes componentes en el medio en el que se lleva a cabo el tratamiento térmico, en este caso la bebida a base de malta; influyen en la resistencia de las distintas cepas a los diferentes tratamientos de calor usados (Jay, 2005).

Las interacciones entre diferentes factores, como temperatura y tiempo de calentamiento, pH, presencia de ácidos y en menor medida a_w , son importantes para la estabilidad de los alimentos ácidos y acidificados (Hansen y Riemann, 1963). Efectos sinérgicos de pH y temperatura de calentamiento permiten que puedan llevarse a cabo tratamientos más suaves en alimentos con pH más bajos, alimentos ácidos con un pH <4.3 usualmente requieren sólo 5 min a 93° C mientras que los productos con pH 4.3-4.5 requieren temperaturas alrededor de 93° C durante 10 minutos (York y col., 1975).

Los resultados obtenidos muestran que no se requieren temperaturas tan altas como las antes mencionadas para obtener una disminución significativa de la poblaciones microbianas, el bajo pH de la bebida permite entonces utilizar tratamientos más suaves (62-72°C) para alcanzar niveles, en la mayoría de los casos, que no signifiquen daños en las propiedades de la bebida a base de malta.

Los azúcares y las proteínas presentes en el producto pudiesen significar una barrera protectora contra algunos de los tratamientos térmicos efectuados, permitiendo así la supervivencia de las distintas cepas bajo la influencia de temperaturas alejadas de su óptimo de crecimiento (Stumbo, 1973). Por un lado, algunas trazas de proteínas pueden mantenerse en solución en el producto; las interacciones electrostáticas producidas entre éstas y las proteínas de membrana de las células (Jay, 2005), supone un aumento en la estabilidad de las mismas enalteciendo su resistencia a elevadas temperaturas. Por otro lado, la sacarosa, abundante en la bebida a base de malta; es uno

de los carbohidratos que mayor aumento en la resistencia al calor genera (Corry, 1974; Goepfert y col, 1970). En general, la presencia de carbohidratos tiende a aumentar la resistencia térmica de los microorganismos, al disminuir la a_w . Por lo tanto la presencia de este azúcar es un factor que pudiese significar otra barrera contra el tratamiento térmico efectuado (Jay, 2005). Esto pudiese explicar la prevalencia de microorganismo como los *Lactobacillus* y algunas cepas de levaduras evaluadas en este ensayo, en la que el tratamiento más fuerte usado (72°C- 20 minutos), fue insuficiente para una disminución eficiente de la población microbiana. La presencia de las altas cantidades de azúcares en la bebida, principalmente sacarosa paliaron el efecto de las altas temperaturas sobre la población microbiana.

Las altas temperaturas generan en las células de levaduras marcados efectos entre los cuales pueden mencionarse: aumento de la fluidez y reducción de la permeabilidad a los nutrientes esenciales, disminución de los ácidos grasos de las membranas insaturadas, estimulación de la actividad ATPasa y RAS-adenilato ciclasa, disminución del pH intacelular. En cuanto a la estructura y función de las mitocondrias genera disminución de la actividad respiratoria e inducción de mutantes deficientes y en consecuencia, se inhibe la respiración y fermentación, y se produce un aumento inmediato de trehalosa celular y ergosterol. Se reprime la síntesis de muchas proteínas, pero se induce la expresión ciertas proteínas de choque térmico. A nivel genético se da un aumento de la frecuencia de mutaciones y del entrecruzamiento de cromosomas, y reparación ineficiente del ADN dañado por el calor (Querol y Fleet, 2006).

Las temperaturas óptimas para el crecimiento de las levaduras se encuentran en un rango de algunos grados bajo cero hasta un máximo de 30-40°C, encontrándose que algunos psicrófilos crecen bien en temperaturas entre 5 y 18°C; los termófilos con un mínimo de 20°C y la mayoría de las levaduras, mesófilas, en un rango de 0 y 48°C (Carlile y col, 2001). Por lo tanto resulta lógico

pensar, que tras la aplicación de los distintos tratamientos térmicos empleados, las levaduras, como microorganismos mesófilos; posiblemente presentaron daños celulares que involucraron la disrupción de membrana, rompimientos de puentes de hidrógeno y la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos. Con esto, se produjo probablemente a la consecuente inactivación de procesos enzimáticos, que provocaron una eventual muerte de la célula (Tortora, 2013).

Las células de levadura presentan una respuesta de choque térmico cuando se exponen a temperaturas subletales transitorias (Querol y Fleet, 2006). Esto implica la inducción de la síntesis de un conjunto específico de proteínas, altamente conservadas, denominadas proteínas de choque térmico (Hsps) (Swan, y Watson, 1998). Estas proteínas son inducidas también cuando las levaduras están expuestas a tensiones distintas del choque térmico (Hohmann y Mager, 2003), por lo que son referidas más bien como proteínas de estrés. Varias Hsps contribuyen a la termotolerancia de la levadura actuando como "chaperonas" moleculares para prevenir la agregación de proteínas (Morano y col., 1998). También promueven la proteólisis de las proteínas anormales dañadas por el estrés (Querol y Fleet, 2006).

Aunque las Hsps no parecen desempeñar funciones directas en el aumento de termotolerancia de las levaduras, Hsp104 parece mejorar los efectos del estrés térmico en los cultivos de respiración de *S. cerevisiae*. De hecho, se encontró que los pretratamientos térmicos leves inducen tolerancia a altas temperaturas. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tales pretratamientos inducen fuertemente la proteína de choque térmico Hsp 104, y las mutaciones de dicha proteína, reducen en gran medida la supervivencia a altas temperaturas, indicando que Hsp 104 juega un papel crítico en la inducción de la termotolerancia (Lindquist y Kim, 1996). Esto podría explicar a nivel fisiológico como algunas de las cepas usadas logran sobrevivir a temperaturas que en principio están alejadas

de sus rangos óptimos de crecimiento, hecho observado con *Rhodotorula rubra* aislada, *Pichia anómala*, *Candida guilliermondii* y *Candida peliculosa*.

Las células de levadura también responden al choque térmico acumulando otros compuestos protectores del estrés como la trehalosa (Ertugay y Hamamci 1997, Neves y François 1992). Estudios han demostrado que este disacárido funciona como termoprotector y crioprotector estabilizando las proteínas y las membranas celulares (Elbein y col., 2003; Singer y Lindquist, 1998) y se acumula marcadamente en las células expuestas a un shock térmico no letal (Querol y Fleet, 2006).

En las levaduras, los estímulos que activan la respuesta al choque térmico también causan la acumulación de trehalosa. De hecho al menos dos subunidades del complejo de trehalosa-6-P sintasa de *S. cerevisiae* se sintetizan activamente durante el choque térmico, y se han encontrado concentraciones fisiológicas de trehalosa (hasta 0,5 M) para proteger las enzimas de levaduras y otros organismos de inactivación por calor *in vitro* (Bell y col., 1992).

En un estudio en que se trabajó con mutantes de levaduras, defectuosas en los genes que codifican enzimas clave en el metabolismo de trehalosa (TPS1, TPS2), se evidenció la incapacidad para acumular este carbohidrato durante un choque térmico leve, y fueron mucho menos resistentes al calentamiento que el organismo de tipo salvaje. Estos estudios sugieren que la trehalosa desempeña un papel clave en la termotolerancia e indican también, que las enzimas que sintetizan trehalosa son inducidas en respuesta al estrés para aumentar los niveles de este compuesto (Elbein y col., 2003).

Singer y Lindquist (1998) demostraron que la trehalosa protege las células del calor mediante la estabilización de proteínas a altas temperaturas. Usando dos diferentes proteínas marcadoras

sensibles a las temperaturas, estos investigadores mostraron que las enzimas son más capaces de mantener su actividad durante un choque térmico en las células que están produciendo trehalosa. Estos estudios mostraron un papel adicional e importante de la trehalosa, que es, la capacidad para suprimir la agregación de proteínas que ya han sido desnaturalizadas. Basándose en estos estudios, estos investigadores también explicaron por qué la trehalosa debe degradarse rápidamente después de que el choque térmico haya terminado. Cuando una de sus proteínas reporteras, se retira o se diluye fuera de la trehalosa, se puede replegar por chaperones moleculares. Por otro lado, si la concentración de trehalosa sigue siendo alta, interfiere con el proceso de replegamiento, y la proteína no es renaturalizada por la chaperona (Singer y Lindquist, 1998).

En otro orden de ideas, los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas de BAL presentan en la bebida una elevada termoresistencia, pudiendo sobrevivir a todos los tratamientos ensayados. Se encontró que para la reducción de 5 unidades logarítmicas en el caso de *Lactobacillus paracasei* se requirieron de 12 minutos a 70°C y de 20 a 72°C (figura 15). Para *Lactobacillus brevis* (figura 16) se requirió un tratamiento de 20 minutos a 72°C para un igual resultado.

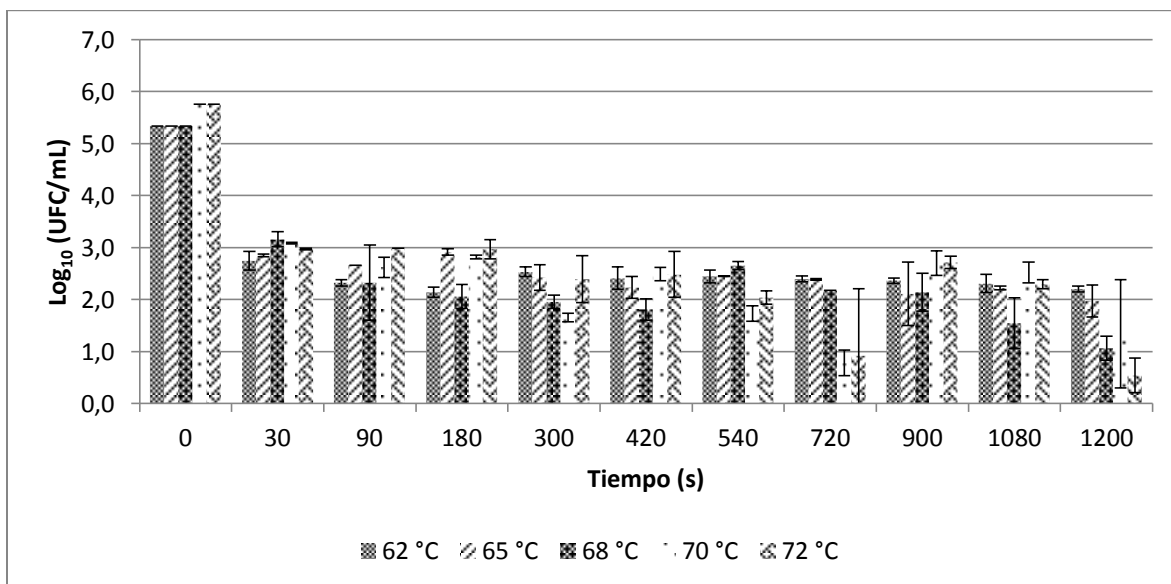


Figura 15. Resistencia de *Lactobacillus paracasei*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

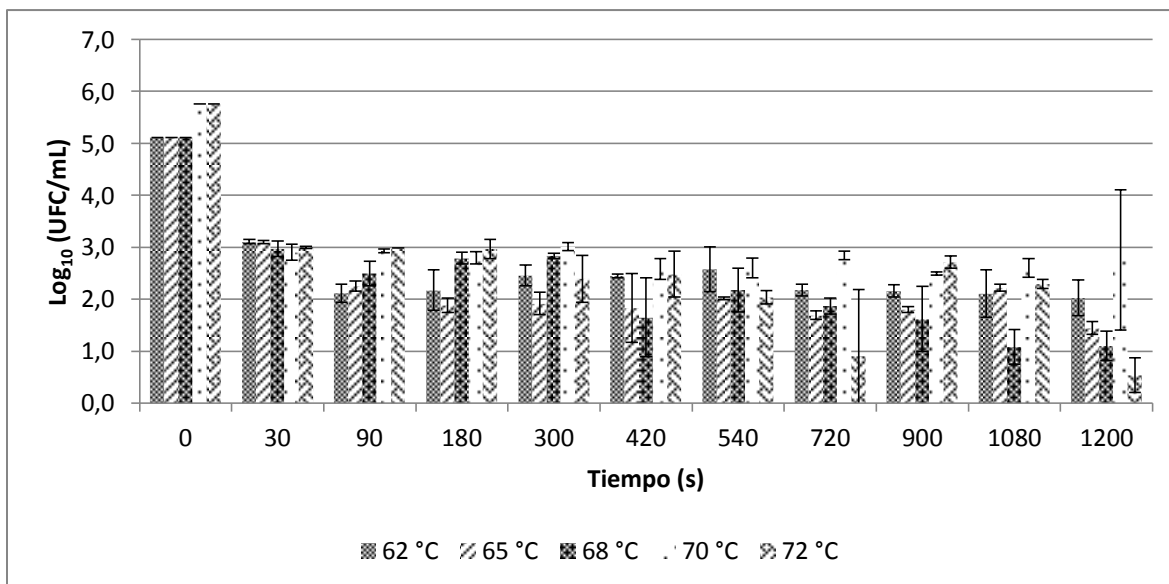


Figura 16. Resistencia de *Lactobacillus brevis*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

Como se mencionó previamente el metabolismo de las BAL en general les permite soportar medios ácidos, la fermentación láctica permite a los *Lactobacillus* crecer en medios con pH más bajos que la mayoría de las BAL. Así, el efecto que pudiese significar el pH en el medio de calentamiento pudiese verse minimizado en este tipo de microorganismos.

Para *Lactobacillus brevis*, cepa homofermentativa, se esperaba, en principio, presentará una mayor termotolerancia debido al menor efecto del pH, producto de la generación de ácido láctico como único metabolito final. Por otro lado, para la cepa heterofermentativa (*Lactobacillus paracasei*) se esperaba una mayor termosensibilidad en comparación con su contraparte homofermentativa. Sin embargo, los resultados no parecen mostrar diferencia significativa debido a que ambas cepas lograron resistir todos los tratamientos, encontrándose que son necesarios los tratamientos más fuertes para lograr la reducción de 5UL. Aunque estos resultados pueden parecer contradictorios, la explicación para esta discordancia podría estar en la falta de homogeneidad en la suspensión bacteriana durante el tratamiento o a la heterogeneidad presente en la población (Jordan y Cogan,

1999) además de las características de la bebida antes mencionadas que pudiesen influir en la resistencia al calor.

Los *Lactobacillus* en general se consideran microorganismos mesófilos. En concreto las cepas con las que se llevó a cabo el estudio crecen en un rango entre 5-45°C. Los tratamientos usados que superan más de 15°C, suponen temperaturas suficientes, por lo menos para inhibir procesos en estas bacterias. Sin embargo, algunos componentes en la matriz como los azúcares pudiesen significar como en las levaduras, una barrera de protección que permitió la prevalencia de estos microorganismos.

Un estudio llevado a cabo con *Lactobacillus paracasei* en cerveza, evidenció la imposibilidad de recuperar sobrevivientes con temperaturas superiores a 55°C (Reveron, 1997). Por otro lado estudios en leche desnatada con el mismo microorganismo, no mostraron reducción a temperaturas de 50-55°C, incluso tras 2 horas de calentamiento. A 60°C si hubo reducción tras los primeros 15 minutos, y pasado este tiempo comenzó a disminuir la población bacteriana. A 65°C hubo muerte en los primeros 5 minutos y se alcanzó la reducción de 5 unidades logarítmicas tras 15 minutos de calentamiento (Jordan y Cogan, 1999). Considerando la mayor cantidad de grasas que posee la matriz en la que se llevó a cabo este último ensayo y el papel de protección que pueden fungir éstas contra los tratamientos térmicos, se esperaría que en una matriz de este tipo existiese una mayor termorresistencia que en el caso de la bebida a base de malta donde los niveles de grasa son bajos. Sin embargo, los resultados muestran una mayor resistencia en la bebida. Probablemente, factores como la presencia de altos niveles de azúcares en la misma, pudieron influir en la termorresistencia de esta cepas ácido lácticas. Estos trabajos demuestran el marcado efecto del medio de calentamiento, pudiendo incluso ser más relevante que la fisiología per se de cada microorganismo.

En cuanto a los microorganismos esporulados, se encontró que de las tres cepas el microorganismo más termorresistente fue *Clostridium butyricum* (figura 17) para el que se requirió una temperatura de 68°C durante 12 minutos. Se encontró, además, la muerte de todos los microorganismos presentes al inicio del experimento, con tiempos más prolongados de tratamiento.

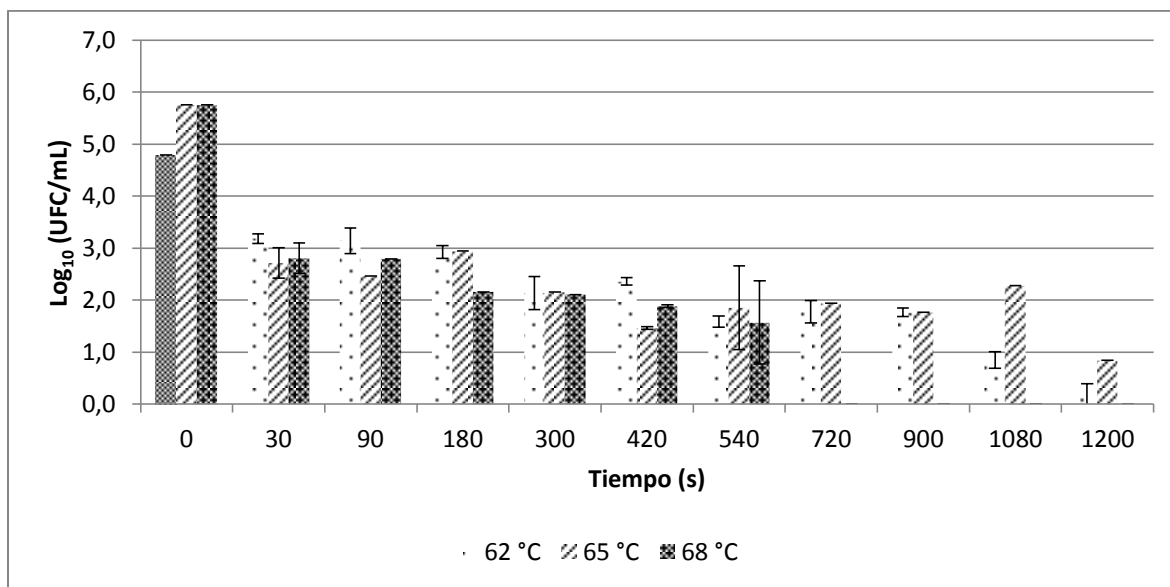


Figura 17. Resistencia de *Clostridium butyricum*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

Clostridium acetobutylicum (figura 18) resultó ser el más termosensible, obteniéndose que con un tratamiento más leve se alcanzó la reducción de 5 UL. Una temperatura de 65°C (durante 15 minutos) fue suficiente para la remoción de 5 UL de esta cepa. Sin embargo, un factor a considerar en este caso en comparación con el anterior, es que el volumen de la población inicial (previo al tratamiento térmico) para *Clostridium acetobutylicum*, fue menor, 1 UL menor. Es imperativo considerar el efecto que la densidad poblacional ejerce sobre un tratamiento térmico, considerando que a mayor número de microorganismos, mayor será la resistencia al calor. De hecho *Clostridium bifermentans* (figura 19), también requirió un tratamiento de 65°C también, pero durante 20 minutos. Para esta cepa, la densidad poblacional previa al tratamiento, fue similar al caso de *Clostridium butyricum*.

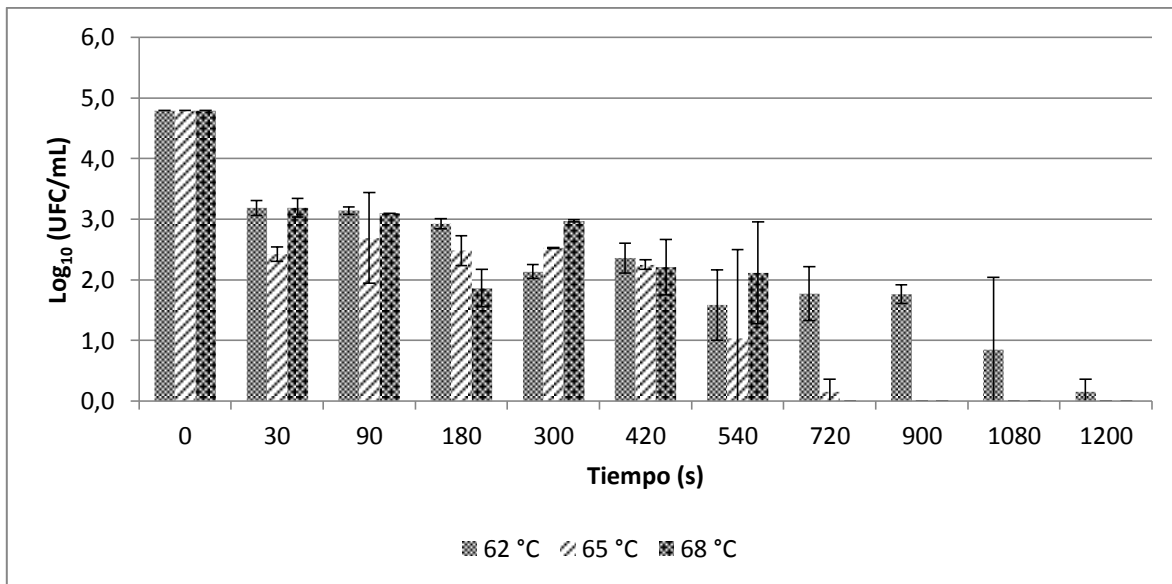


Figura 18. Resistencia de *Clostridium acetobutylicum*, sometidas a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

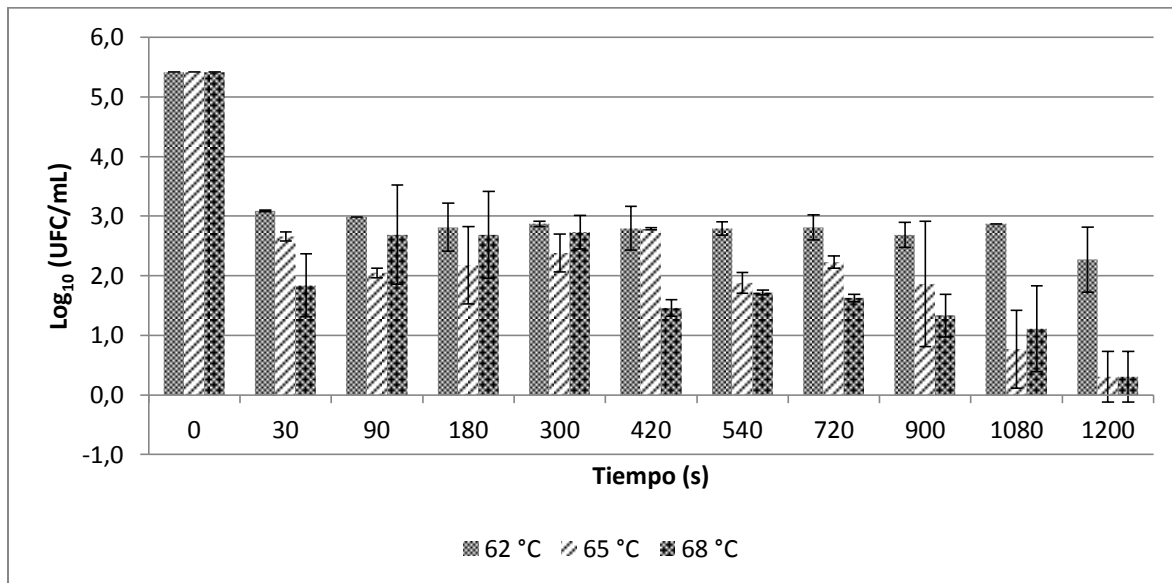


Figura 19. Resistencia de *Clostridium bifermentans*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

Como se mencionó previamente, en condiciones de estrés, como pueden suponerlo un tratamiento térmico o el pH de un producto, los microorganismos esporulados desarrollan un mecanismo de

sobrevivencia que les permite mantenerse latentes hasta que las condiciones del medio son las ideales para que se estimule la germinación.

La estructura de las esporas están compuesta por: el exosporio, la capa más externa y de naturaleza proteica; bajo ésta se ubica la cubierta, compuesta de varias capas de proteínas específicas de la espora. Debajo de ésta se sitúa el cortex, compuesta de peptidoglicano con uniones laxas, internamente y bajo esta se encuentra el núcleo o protoplasto de la espora que contiene la pared celular de la forma vegetativa, la membrana citoplasmática, el citoplasma, el nucleóide, etc (Madigan, 2003).

Se cree que el core o núcleo de la espora es el principal responsable de dotar a esta estructura de protección contra las altas temperaturas (Marquis y col, 1994). Por un lado, el contenido de agua (10-30% del agua de la célula vegetativa) es bajo, lo que contribuye a la resistencia al calor húmedo y la inactivación enzimática. De hecho, cuando inicia la fase de germinación se ha reportado una rápida toma de agua desde el núcleo, estimulándose así los distintos procesos enzimáticos que conllevan a un rompimiento de la latencia (Marquis y col, 1994). Además, esporas con menor contenido de agua en el protoplasto son más resistentes que aquellas con niveles de agua mayores (Beaman y Gerhardt, 1986).

Por otro lado, el ácido dipicolínico (DPA) que corresponde a un 5-15% del peso seco de la espora es quelado en relación 1:1 con un ion divalente, principalmente calcio (Ca^{+2}). La acumulación de un amplio depósito de DPA contribuye a la reducción del contenido de agua durante la esporulación y en consecuencia con el aumento de la resistencia térmica (Marquis y col, 1994; Stumbo, 1973).

El pH del citoplasma de la endospora es aproximadamente una unidad menor que el de la célula vegetativa y contiene elevados niveles de unas proteínas específicas, pequeñas proteínas acido-

solubles, acuñadas bajo el acrónimo SASP, por sus siglas en inglés. Se localizan en la membrana interna y son abundantes en las esporas, corresponden con 3-6% de total de las proteínas de las esporas (Marquis y col, 1994).

Estas proteínas se forman sólo durante el proceso de esporulación (Stumbo, 1973). De hecho, desaparecen junto al DPA y componentes del córtex durante la germinación (Powell y Strange, 1953) y tienen al menos dos funciones: una es asociarse con el ADN protegiéndolo así de lesiones potenciales de radiación UV, desecación, calor seco y algunos compuestos químicos. El otro rol de estas proteínas recae en que pueden ser degradadas durante la germinación, pues suponen una fuente de carbono para el desarrollo de la forma vegetativa (Madigan, 2003). Las esporas de *B. subtilis* deficientes para la síntesis de SASPs han mostrado ser más sensibles al calor que aquellas con producción normal de estas proteínas (Mason y Setlow, 1986).

Así, en principio, considerando las temperaturas de crecimiento de estos microorganismos, su sensibilidad al calor y a bajos pH, se presumía se indujera la esporulación durante los tratamientos térmicos, en un efecto asociado tanto por el bajo pH del producto como por la elevación de la temperatura del medio, y con esto se recuperará una cantidad de microorganismos similar a la inoculada, como sucedió en el trabajo de Paciello (1998). En dicho trabajo, se logró recuperar en una bebida gaseosa, una población de esporas de *Clostridium* con un orden de magnitud similar a la población inoculada. Mientras tanto, los resultados obtenidos en esta investigación, sin embargo; distan de esta conjetura y muestran que estos microorganismo luego de recibir el tratamiento térmico y ser colocados en la placa de cultivo, lograron ser reducidos 5 UL (Tabla 3).

La discordia entre los resultados obtenidos y esperados pudiese encontrar una explicación en la matriz utilizada (bebida a base de malta), la cual al parecer generó un ambiente de estrés para los

microorganismos ensayados y desencadenó el proceso de esporulación. Este último, probablemente, se inició en algunas células, mientras un gran número de individuos en la población pudo haber muerto (como probablemente sucedió durante los ensayos en los retos microbianos) seleccionándose así sólo esporas, que posteriormente soportarían los tratamientos térmicos realizados. Éstas a su vez pudiesen desencadenar la posterior germinación en las placas de cultivo (Madigan, 2003). Esto último, se sustenta en reportes donde se demuestra que el choque térmico puede jugar un papel muy importante en la germinación de las esporas que contaminan los alimentos. Barnes y colaboradores (1963); reportaron que, sin un choque térmico previo, sólo germinaba alrededor de un 3% de las esporas presentes en la carne cruda, pero casi todas germinaban después de que la carne había sido calentada.

Otra explicación para que no se recuperasen tantos sobrevivientes como se esperaba, pudiese ser el medio usado para dicho fin, medio Diferencial y Reforzado para Clostridios (DRCM). Paciello, (1998); demostró que este medio no permite la recuperación real de las esporas de *Clostridium* sp medianamente dañadas, solo de las viables. Además el estado físico del medio (sólido o líquido) influye sobre la viabilidad de las esporas, siendo el medio líquido de mejor aprovechamiento para los microorganismos, según dicho estudio.

En general, el estudio de la resistencia al calor de las esporas bacterianas es notoriamente difícil debido a la influencia de diferentes factores tales como la temperatura de esporulación, el medio de esporulación, el medio de calentamiento, el método de calentamiento y las condiciones de recuperación. En términos de reproducibilidad y comparaciones de la resistencia al calor para este tipo de microorganismos hay una serie de incertidumbres, incluso repetir el mismo experimento de calentamiento con diferentes cultivos de esporas de la misma cepa, utilizando exactamente las

mismas condiciones de preparación y calentamiento, puede dar diferentes resultados de resistencia al calor (Blackburn, 2006).

5.4 Cálculo de parámetros cinéticos

Para el cálculo de estos parámetros cinéticos se consideraron sólo a aquellos microorganismos que mostraron crecimiento durante el ensayo de los retos microbianos; así como aquellos en los que no se observó una reducción de 5 UL luego de los tratamientos térmicos. Los mismos fueron: *Rhodotorula rubra* aislada de un proceso industrial, *Pichia anomala*, *Candida guilliermondi*, *Candida peliculosa*, además de ambos miembros del género *Lactobacillus*. Se asume que si un tratamiento térmico mantiene a niveles permitidos a estos microorganismos, también lo hará, con los microorganismos que presentaron menor termorresistencia, durante los ensayos térmicos.

Considerando los tratamientos térmicos efectuados, con el cálculo del valor D, parámetro cinético que permite evaluar la resistencia de un organismo a una temperatura específica, se puede discernir entre un grupo de microorganismos y evaluar cuál presenta mayor resistencia a dicho tratamiento térmico, con el fin de diseñar una combinación de tiempo-temperatura que asegure la calidad de la bebida.

Rhodotorula rubra, *Candida Guilliermondi*, *Candida peliculosa* y *Pichia anomala*; resultaron ser las cepas de levaduras las más resistentes. De estas cuatro, la *Rhodotorula rubra*, resultó ser la más resistente de las 4, requiriendo de un tratamiento de 72°C para la eliminación de 5 UL. Por otro lado aunque las otras tres, con tratamientos similares de 70°C disminuyen las 5 UL, *Pichia anomala* requirió de mayor tiempo. De hecho al observar los valores D_{70} (tabla 4), es mayor el valor de *Pichia anomala* que el de las otras 2 cepas de levadura. De esta manera, se apreciaron como las cepas

más resistentes las levaduras: *Pichia anomala* y *Rhodotorula rubra*, con valores de tiempo de reducción decimal más altos, para el mismo tratamiento térmico.

Tabla 4. Valores de tiempo de reducción decimal de los microorganismos más termorresistentes para cada temperatura evaluada.

Cepa	T (°C)	Valor D (min)
<i>Rhodotorula rubra aislada</i>	62	13,9
	65	11,9
	68	18,5
	70	7,9
	72	4,0
<i>Pichia anomala</i>	62	11,1
	65	13,9
	68	11,9
	70	4,9
	72	6,2
<i>Candida Guillermondi</i>	62	15,2
	65	12,8
	68	16,7
	70	3,5
	72	3,8
<i>Candida peliculosa</i>	62	16,7
	65	12,8
	68	11,1
	70	3,8
	72	4,4
<i>Lactobacillus brevis</i>	62	15,2
	65	11,9
	68	7,9
	70	10,4
	72	7,9
<i>Lactobacillus paracasei</i>	62	16,7
	65	12,8
	68	12,8
	70	11,1
	72	7,9

Con *Pichia anomala* se alcanza una reducción de 5UL con 68°C, con *Rhodotorula rubra* aislada, a esa temperatura y tiempo no se alcanza dicha reducción. Sin embargo *Pichia anomala*, con

temperaturas de 70 y 72°C necesita 15 y 20 min para una reducción eficiente, como se observa en la tabla 3.

Rhodotorula rubra, alcanza una reducción eficiente con temperatura de 72°C. Si se tiene esto en cuenta, pareciese incongruente que se obtuviese un valor D mayor para *Pichia anomala* que para *Rhodotorula rubra* (tabla 4). Esto se encuentra asociado a la cantidad de sobrevivientes que se recuperan tras cada tratamiento, lo que influencia en la pendiente de las rectas para cada temperatura y en última instancia en el valor D de cada microorganismo. Si se observan la curvas de tratamiento térmico (figuras 20 y 21) para cada uno de estos microorganismos, son apreciables valores de pendientes muy similares para todas las temperaturas, por lo tanto; ambos serán tomados como microorganismos “blanco” para el tratamiento de pasteurización.

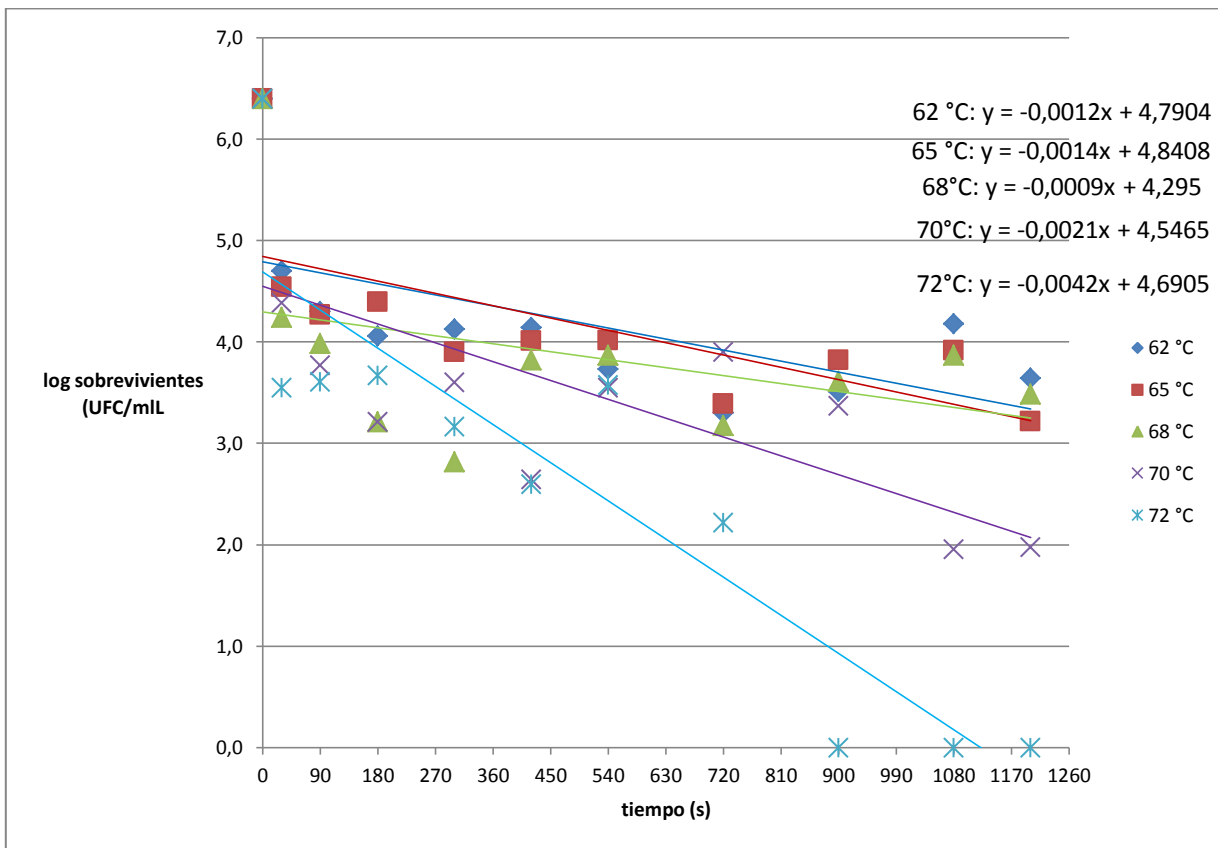


Figura 20. Curva de sobrevivencia térmica de *Rhodotorula rubra* aislada, se muestran las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada tratamiento.

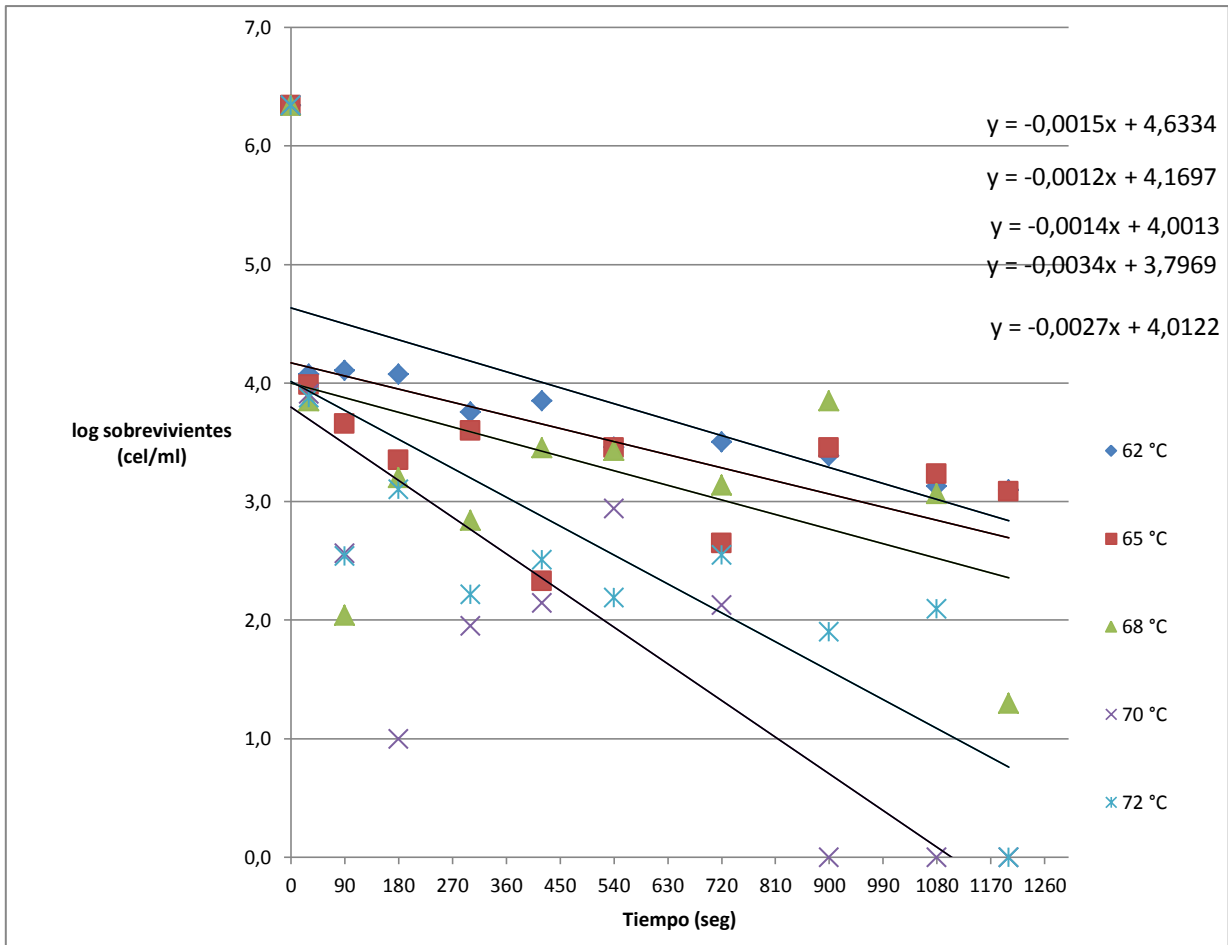


Figura 21. Curva de sobrevivencia térmica de *Pichia anomala*, se muestran las ecuaciones de las rectas correspondientes a cada tratamiento.

Para los *Lactobacillus*, bacterias que mostraron en este estudio presentar la mayor termostabilidad además de que han mostrado ser los principales contaminantes en este tipo de bebidas; se han encontrado valores D_{65} en un rango de entre 1-3 minutos y valores Z de entre 4-5,5°C (Reveron, 1997). Collier y Townsend (1954) indicaron que la resistencia térmica del más resistente de los *Lactobacillus* estudiados presentó un valor de D_{65} cercano a 1 min y un Z de 5,5; en jugo de tomate o pasta de tomate. En cerveza tipo lager, se halló para una cepa de *Lactobacillus* un valor D_{65} de 0,31 minutos (Reveron, 1997).

En el trabajo de Reveron, 1997; se encontró que a temperaturas superiores a 55°C no se recuperan sobrevivientes y el valor D a 60°C es de 0,02 min, en cerveza Pilsen; menor al valor encontrado en cerveza lager.

Como se evidencia los resultados encontrados en la literatura distan mucho de los arrojados por este estudio, en la bebida a base de malta. Debe considerarse en principio la metodología usada en cada uno de los trabajos, además, los parámetros cinéticos reseñados previamente corresponden a estudios en matrices con algunas características distintas a las bebidas a base de malta, como el contenido de azúcar, que pareciera dotar a los microorganismos de una alta resistencia a muerte por calor.

El valor F o valor de esterilización mide la letalidad del tratamiento por calor y es el tiempo necesario a una temperatura de referencia, para lograr la inactivación o destrucción de las células vegetativas o esporas de un particular organismo.

De las levaduras, la *Rhodotorula rubra* aislada, mostró ser la más resistente a las temperaturas, sin embargo ésta mostró durante los retos microbianos que con un bajo nivel de inóculo su crecimiento no se dispara hasta niveles que generen daños organolépticos en el producto. Las dos BAL ensayadas resultaron presentar una resistencia al calor similar a la de *Rhodotorula rubra aislada*, pero además de esto, cuando se probó con un nivel de inóculo muy bajo (0,01 cell/mL) su resistencia en la matriz, alcanzó niveles que generaban daño en la bebida. Tomando esto en cuenta, se consideró para el cálculo del valor F un Nf de 10^{-4} , valor, dos unidades logarítmicas por debajo del nivel de inóculo más bajo probado para esta cepa. Esto implicaría una probabilidad de $1/10^4$ de que sobreviva alguna célula tras la aplicación del tratamiento térmico (Pfug, 1987). El valor N₀ se tomó en función de una contaminación real a nivel de planta y fue considerado el valor de 100 cél/mL.

El microorganismo que resultó presentar un valor F mayor (tabla 5), para temperaturas de 68 °C fue *Rhodotorula rubra* aislada, mientras que para 65°C fue *Pichia anómala*. Esto implicaría que se requeriría de un tratamiento de 111 minutos a 68°C para la remoción de todos los microorganismos partiendo de una población inicial de 100 cél/mL. Por otro lado, se requerirían de 83 minutos a 65°C para el mismo escenario. Las incoherencias entre la necesidad de un mayor tiempo a mayor temperatura, está directamente asociada al valor D, y esto tiene que ver con la probabilidad de captura durante la recuperación mientras se realizaban los ensayos de tratamientos térmicos.

Es imperativo reseñar que la excesiva resistencia mostrada por los microorganismos en este estudio está directamente relacionada con la metodología utilizada, el valor Nf estipulado para el cálculo del valor F viene dado en principio a partir de los estudios de los retos microbianos. En estos no se pudo determinar totalmente el efecto del dióxido de carbono sobre los microorganismos, por lo que es una variable que no se maneja y que pudiera significar un mayor daño a los microorganismos que lo aquí señalado. Podría sugerirse entonces que considerando este último parámetro, podrían estipularse valores de Nf más altos y en consiguiente valores F más cortos.

La temperatura de 68°C sería la usada para el procesamiento de pasteurización, esto basado en que los tratamientos de pasteurización usados generalmente en procesos cerveceros son de 65°C durante 12 minutos. Sin embargo, la cerveza contiene lúpulo, componente que ha mostrado tener propiedades antimicrobianas, por lo que podría asumirse se requerirá mayor temperatura para la malta, cuyo elevado contenido de azúcar supone un aumento en la termorresistencia de los microorganismos.

Tabla 5. Valores F obtenidos para los microorganismos más termorresistentes.

	T (°C)	No (cel/mL)	Nf (cel/mL)	valor F (minutos)
<i>Rhodotorula rubra</i> aislada	65	10 ²	10 ⁻⁴	71,4
	68	10 ²	10 ⁻⁴	111,1
<i>Pichia anomala</i>	65	10 ²	10 ⁻⁴	83,3
	68	10 ²	10 ⁻⁴	71,4
<i>Candida guilliermondii</i>	65	10 ²	10 ⁻⁴	76,9
	68	10 ²	10 ⁻⁴	100,0
<i>Candida peliculosa</i>	65	10 ²	10 ⁻⁴	76,9
	68	10 ²	10 ⁻⁴	66,7
<i>Lactobacillus brevis</i>	65	10 ²	10 ⁻⁴	71,4
	68	10 ²	10 ⁻⁴	47,6
<i>Lactobacillus paracasei</i>	65	10 ²	10 ⁻⁴	76,9
	68	10 ²	10 ⁻⁴	76,9

El cálculo de los valores z (tabla 6) permite postular diversos tratamientos térmicos variando las condiciones de tiempo y temperatura. En función de estos se pueden diseñar distintos procesos de pasteurización que en principio deberían llevar a resultados equivalentes, la calidad de la bebida, sin afectar las características de la misma (Jay, 2005). Esto es particularmente importante si se considera que sería muy difícil llevar un tratamiento térmico durante un tiempo de 111 minutos si no se cuenta con un equipo que así lo permita (tanques), mientras que tratamientos más cortos como el de 11 o 1,1 minutos son tratamientos más adecuados en términos de costo y tiempo.

Partiendo de esto y de los valores Z calculados, se diseñará el proceso de pasteurización para la malta. Los tratamientos equivalentes se evidencian en la tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos equivalentes postulados a partir de los valores Z para cada microorganismo.

Cepa	valor Z (°F)	T (°F)	T (°C)	Tiempo (min)
<i>Rhodotorula rubra</i> aislada	39,2	115	46	120
		154	68	12
		193	89	1,2
<i>Pichia anomala</i>	49,3	105	41	120
		154	68	12
		203	95	1,2
<i>Lactobacillus brevis</i>	70,0	84	29	120
		154	68	12
		224	107	1,2
<i>Lactobacillus paracasei</i>	65,4	89	32	120
		154	68	12
		219	104	1,2

Fundamentado en los valores de los parámetros cinéticos obtenidos, *Lactobacillus paracasei* (cepa de las dos usadas que ha mostrado mayor termorresistencia en estudios previos) así como *Pichia anomala* y *Rhodotorula rubra* aislada, fueron los microorganismos en torno a los cuales se diseñó el procesamiento de pasteurización, el cual, se llevara a cabo con una temperatura de 68°C y 12 minutos.

5.5 Pruebas a nivel de laboratorio de condiciones de tiempo y temperatura propuestas

Evaluando las posibilidades ofrecidas, en términos energéticos del pasteurizador usado en planta, se partió de un procesamiento de pasteurización de 12 minutos a 68°C como base.

Como se reseñó previamente es posible utilizar tratamientos equivalentes cambiando las condiciones de tiempo y temperatura, sin embargo los valores z arrojados por dichos experimentos sugieren tratamientos que comprometen la integridad del producto, o por el contrario, tratamientos más suaves sugieren tiempos muy extensos.

Los resultados obtenidos (tabla 7) sugieren que tratamientos como los usados regularmente en cerveza (65°C) ofrecen los mismos resultados en función de calidad para la bebida a base de malta. Incluso al ensayar tratamientos de tan solo 62 °C durante el mismo tiempo, se obtuvieron resultados que llevan a valores deseados en la cantidad de microorganismos; es decir se mantienen la inocuidad del producto.

Tabla 7. Tratamiento de pasteurización, inóculo de 2UL.

Cepa	T (°C)	log UFC/mL antes	UFC/mL después
<i>Pichia anomala</i>	62	2,08	<1
	65	2,07	<1
	68	2,05	<1
<i>Rhodotorula rubra aislada</i>	62	2,08	<1
	65	2,04	<1
	68	2,28	<1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	62	2,30	<1
	65	2,34	<1
	68	2,49	<1

Considerando la sobrevivencia de los microorganismos a temperaturas de 62°C durante 12 minutos en los ensayos de sobrevivencia térmica, resultan interesantes los valores obtenidos con el proceso de pasteurización planteado. Se esperaba obtener sobrevivientes con este ensayo de pasteurización en el laboratorio. No obstante, como se observa en la tabla 7, no hubo sobrevivientes, posiblemente, debido al primer golpe de temperatura al que se ven sometidos los microorganismos durante esta pasteurización simulada (80°C, similar a la pasteurización flash), así como al tiempo que pasa durante la fase de enfriamiento (baño a 40°C) una vez terminado el tratamiento de 12 minutos. De hecho, los ensayos de resistencia térmica mostraron que se producía una reducción importante, si bien no eficiente (5 UL); de la población bacteriana tras solo el contacto con el producto (30 segundos) a elevada temperatura (figuras 13-19 y 28, 29 anexos).

Así no solo el proceso de pasteurización genera un impacto en la sobrevivencia microbiana sino que además las etapas de calentamiento y enfriamiento suman para mantener la integridad del producto.

Los resultados obtenidos sugieren entonces, que tratamientos como el usado en cerveza es suficiente para mantener bajo control las poblaciones microbianas, incluso tratamientos más suaves (62°C) mostraron una reducción de 2 unidades logarítmicas (contaminación probable) para cualquiera de los microorganismos. Inclusive cuando se aumentaba el inóculo a 6 unidades logarítmicas, condición muy alejada de lo real, se encontró una reducción total de los mismos (tabla 8).

Cabe destacar que estos resultados que en principio pareciesen mantener la estabilidad microbiológica del producto mediante la eliminación de la carga microbiana, responde a un proceso de laboratorio, condición muy alejada del proceso de pasteurización a realizarse en la planta donde el rociado de la botella por la pasteurización en túneles es muy distinta a la sumersión de las mismas en un baño; por lo que ensayos a nivel de planta son necesarios para evaluar la eficiencia del diseño de pasteurización aquí estipulado.

Tabla 8. Tratamiento de pasteurización, inóculo de 6 UL

Cepa	°T (°C)	log UFC/mL antes	UFC/mL después
<i>Pichia anomala</i>	62	5,97	<1
	65	6,05	<1
	68	6,02	<1
<i>Rhodotorula rubra aislada</i>	62	6,15	<1
	65	5,68	<1
	68	5,70	<1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	62	5,50	<1
	65	5,54	<1
	68	5,55	<1

6. CONCLUSIONES

Las levaduras y bacterias ácido lácticas encontraron en la bebida un medio óptimo para su prevalencia, adaptándose a las características de la misma; además los miembros del género *Clostridium*, por su capacidad de formar esporas, logran mantenerse latentes en el producto pudiendo significar un riesgo para la bebida. Por otro lado, los microorganismos patógenos mostraron una elevada sensibilidad a las características de la bebida lo que limitó su permanencia en la misma. Esta adaptación de los microorganismos en la matriz de la bebida, permitió su sensibilización en el estudio de su comportamiento en el tiempo.

Las características bioquímicas de las levaduras y BAL ensayadas, permiten a estos microorganismos crecer en ambientes con bajos pH, elevados niveles de azúcares y bajos niveles de oxígeno, como lo significa la bebida a base de malta, alcanzando así, niveles que implican daños organolépticos en el producto. Por otro lado, el pH evita el crecimiento de los *Clostridium*, pero el mecanismo de resistencia conocido como esporulación les permite a éstos mantenerse en el producto en forma latente.

Rhodotorula rubra, *Pichia anomala*, *Candida guilliermondii*, *Candida peliculosa*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis*; mostraron una elevada termorresistencia sobreviviendo los tratamientos térmicos mas fuerte efectuados debido a mecanismos de repuesta a elevadas temperaturas, intrínsecos de cada microorganismo, así como componentes presentes en la bebida que permitieron su sobrevivencia tras procesos de calentamiento.

Para la formulación de una metodología de pasterización eficiente se calcularon parámetros cinéticos D, Z y F que permitieron establecer a *Rhodotorula rubra aislada de proceso*, *Pichia*

anómala y *Lactobacillus paracasei* como los microorganismos blancos a fin de asegurar la inocuidad y calidad del producto.

El tratamiento de pasteurización postulado fue 62°C durante 12 minutos, el mismo se probó a nivel de laboratorio y mostró asegurar la estabilidad microbiológica de la bebida a base de malta al eliminar inóculos de 100 cél/mL y 10⁶ cél/mL.

7. RECOMENDACIONES

Probar a nivel de planta las condiciones de tiempo y temperatura probadas a nivel de laboratorio para evaluar el comportamiento del proceso y asegurar así la estabilidad del producto, previo a su salida al mercado.

El mayor valor F obtenido (*Rodothorula rubra* 68°C) permite establecer un tiempo de calentamiento que lleva a niveles deseables la población microbológica, sin embargo, este está asociado a los ensayos de retos microbianos en los cuales, no se evidencio por completo el efecto de la matriz (en concreto, el efecto del dióxido de carbono) por lo que se puede reformular la metodología usada para dicho estudio, procurando mantener los niveles de dióxido de carbono por mayor tiempo. Se sugiere una metodología alternativa en la que se utilicen botellas tapadas (3 botellas) inoculándolas probando los mismos niveles de inóculo, en un tiempo cero y evaluar el crecimiento en cada una (5,10, 15 días; una botella cada 5 días).

Aumentar el número de muestras para los ensayos de resistencia térmica para de esta manera aumentar la sensibilidad del estudio.

Basado en los valores z calculados en este estudio, pueden probarse tratamientos de pasteurización con temperaturas mayores que involucran tiempos de tratamientos más cortos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andraesen, A., Stier. T. 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cél. Comper. Physiol* **41**:23–26
- Andraesen, A., Stier. T. 1954. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cél. Comper. Physiol* **54**:271–281
- Ashurst, P., Hargitt, R. 2009. *Soft Drink and Fruit Juice Problems Solved*. Editorial CRC Press, Primera Edición, Florida, E.U. A.
- Ashurts, P. 2016. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*. Editorial Wiley Blackwell, Primera Edicion.
- Back, W., Bohak, I., Ehrmann, M., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K. 1999. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a soft drink spoilage bacterium. *J. Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 354–359.
- Back, Werner. 2005. *Colour atlas and handbook of beverage biology*. VerlagHans Carl: Nürnberg, Germany.
- Baird-Parker, A., Boothroyd, M., Jones, E. 1970. The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of salmonellae. *J.Appl Bacteriol.* **33**:515-522.
- Barnett, J., Sims, A. 1982. The requirement of oxygen for the active transport of sugars into yeasts. *J. Gen. Microbiol* **128**:2303–2312
- Barnett,A., Karl-Dieter, E. 2005 A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**:835-894.
- Baronofsky, J., Schreurs, W., Kashket, E.1985. Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticurn*. *Appl. Environ.Microbiol.* **48**: 1134-1139.

- Battey, A.S. and Schaffner, D.W. (2001). Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Applied Microbiology* **91(2)**, 237–247.
- Battey, A.S. and Schaffner, D.W. (2001). Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Applied Microbiology* **91(2)**, 237–247.
- Beaman, T., Gerhardt, P. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Appl. Environ. Microb* **52**, 1242-1246.
- Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P., Wiemken, A. 1992. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and the cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.* **209**, 951–959.
- Beuchat, L.1983.Influence of Water Activity on Growth, Metabolic Activities and Survival of Yeasts and Molds. *J Food Protect.* **46**: 135-140.
- Bigelow, W. D., Esty, J. R. (1920). Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Diseases*, **27**: 602-617.
- Bjorck, L. 1978. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *J Dairy res.* **49**: 109-118.
- Blacburn, C. 2006. Food spoilage microorganisms. Editorial CRC Press, Primera Edición, Florida, E.U.A.
- Booth, I. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49(4): 359–378.

- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., Stevens, R. 2004. *Brewing: Science and practice*. Editorial CRC Press. Primera Edición, Florida, E.U.A.
- Briggs, D., Boulton, P., Brokes, P., Stevens, R. 2004. *Brewing: Science and Practice*. Editorial CRC Press, Primera Edición, Florida, E.U. A.
- Carlile M., Watkinson, S., Gooday, G. 2001. *The Fungi*. Academic Press, Segunda Edición San Diego, USA.
- Chung, H., Bang, W., Drake, M. 2006. Stress Response of *Escherichia coli*. *J Food Sci.* **5**: 52-64. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x/full> [Consulta 12 de septiembre de 2016]
- Cobley, J., Cox, J. 1983. Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiol. Revs.* **47**: 579-595.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1995. Norma Venezolana N°2182:1995. Bebidas gaseosas. Primera Revisión. Comité técnico CT-10 Productos alimenticios, FONDONORMA, Caracas, Venezuela.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1995. Norma Venezolana N°2178:85. Alimentos comercialmente estériles. Evaluación de la esterilidad comercial Primera Revisión. Comité técnico CT-10 Productos alimenticios, FONDONORMA, Caracas, Venezuela.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 2002. Norma Venezolana N°2615:2002. Malta. Segunda Revisión. Comité técnico CT-10 Productos alimenticios, FONDONORMA, Caracas, Venezuela.
- Cook y Gilbert, 1968... Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food. Technol.* **3**: 295-302.

- Corry, J. 1974. The effect of sugars and polyols on the heat resistance of salmonellae. *J. Appl. Bacteriol.* **37**: 31-43
- Cummings, J., Stephen, A. 2007. Carbohydrate terminology and classification. *EUR J CLIN NUTR.* 61: 5-18. <http://www.nature.com/ejcn/journal/v61/n1s/full/1602936a.html> [consulta 19 de septiembre de 2016]
- Czajka, J. and Batt, C.A. (1996). A solid phase fluorescent capillary immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and apple cider. *Journal of Applied Bacteriology* **81(6)**: 601–7.
- Czajka, J. and Batt, C.A. (1996). A solid phase fluorescent capillary immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and apple cider. *Journal of Applied Bacteriology* **81(6)**: 601–7.
- Daniels, J., Krishnamurthi, R., Rizvi, S. 1984. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food. Protect.* **48 (6)**:532-537.
- Deak T, Beuchat LR (1996) Handbook of food spoilage yeasts. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Deak, T. 1991. Foodborne yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* **36**: 179–278.
- Dixon, N., Kell, D. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* **67**:109–136
- Does, A., Bisson, L. 1989. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. *J. Bacteriol.* **171 (3)**: 1303-1308
- Elbein, A., Pan, Y., Pastuszak, I., David, C. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **4**:17-27.
- Eraso, P. and Gancedo, C. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**: 187–192.

- Ertugay N, Hamamci H. 1997. Continuous cultivation of bakers' yeast: change in cell composition at different dilution rates and effect of heat stress on trehalose level. *Folia. Microbiol.* **42**:463–467.
- Fellows, P. 2000. Food processing technology: Principle and practice. Editorial CRC Press. Segunda Edición, Florida, E.U.A.
- Foster, T., Vasavada, P. 2003. Beverages Quality and Safety. Editorial CRC Press, Primera Edición, Florida, E.U.A.
- Gaillard, S., Leguerinel, I., Mafart, P. 1998. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *bacillus cereus* spores. *J Food Sci.* **63**: 887-889.
- Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., Staley, J. 2004. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol 2, Part B. Editorial Board, Segunda Edición, E.U.A.
- Gillepsi, T. 1962. The principles of heat sterilization. *Recent Adv. Food Sci.* **2**: 93-105
- Goepfert, J., Iskander, K., Amundson, C. 1970. Relation of the heat resistance of salmonellae to the water activity of the environment. *Appl. Microbiol.* **19**: 429-433
- Goepfert, J., Iskander, L., Amundson, C. 1970. Relation of the heat resistance of salmonellae to the water activity of the environment. *Appl. Microbiol.* **19**:429-433.
- Grutzmacher, J. 1991. Significance of oxygen for brewers' yeast. *Brauwelt* **131**:958–959.
- Hansel, J., Spiegelman, G., Halvorson, H. 1970. Bacterial spore outgrowth: Its regulation. *Science.* **168**: 1291.1298.
- Hansen, N., Riemann, H. 1963. Factors Affecting the Heat Resistance of Nonsporing Organisms. *J. Appl. Microbiol.* **3**: 314-333
- Harold, F. 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol. Rev.* **36(2)**: 172–230.

- Hicks D. 1990. Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. Editorial Blackie, 15a Ed, Glasgow, Escocia.
- Hohmann, S., Mager, W. 2003. Yeast Stress Responses. Editorial Springer, Berlin, Alemania.
- Hough, J. 1990. Biotecnología de la cerveza y malta. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Huang, L., Gibbins, L., Forsberg, C. 1985. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1043-1047.
- Huesca, I., Sanchez, J., Bandala, E. 2014. Métodos para la inactivación de esporas en alimentos. Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Institute of Food Technologists (IFD), 2003. COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY: Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods. Volumen 2: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=5FC8780B2A0AC946957CF5B87588B83A?doi=10.1.1.726.8728&rep=rep1&type=pdf> [consulta: 5 de febrero de 2017]
- Jay, J. M. 2005. Modern Food Microbiology. Editorial Board, Séptima Edición, Maryland, E.U. A.
- Johnson, M. 1967. Aerobic microbial growth at low oxygen concentrations. *J. Bacteriol.* **94**:101–108
- Jordan, K., Cogan, T. 1999 Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddarcheese. *Appl. Microbiol.* **29**: 136–140
- Juvonen, R., Virkajärvi, V., Priha, O., Laitila, A. 2011. Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverages. JULKAISIJA – UTGIVARE – PUBLISHER, Finlandia.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**: 209–224.

- Kashket, E. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS. Microbiol. Rev.* **3 (3)**: 233-244.
- Kashket, S., Kashket, E. 1985. Dissipation of the proton motive force in oral streptococci by fluoride. *Infect. Immun.* **48**: 19-22.
- Knatchbull, F., Slaughter J. 1987. The effect of low CO₂ pressures on the absorption of amino acids and production of flavour-active volatiles by yeast. *J. Inst. Brew* 93:420–424
- Kobayashi, H. 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**: 72-76.
- Kobayashi, H., Murakami, N., Unemoto, T. 1982. Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **257**: 13246-13252.
- Kobayashi, H., Unemoto, T. 1980. *Streptococcus faecalis* mutants defective in regulation of cytoplasmic pH. *J. Bacteriol.* **143**: 1187-1193.
- Kooiman, W., Joyce, G. 1974. Simple and Accurate Technique for the Determination of Heat Resistance of Bacterial Spores. *J. appl. Bact.* **38**:185-189
- Levine, M., Buchanan, J. H., y Lease, G. 1927. Effect of concentration and temperature on germicidal efficiency of sodium hydroxide. *J. Sci.* **1**: 379.
- Lightfoot, N., Maier, E. 1998. Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance. Editorial Elsevier Science, Primera Edición, Bruselas, Bélgica.
- Lindquist S, Kim G. 1996. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5301–5306
- Lumsden, W., Duffus, J., Slaughter, J. 1987. Effects of CO₂ on budding and fission yeasts. *J. Gen. Microbiol* **133**:877–881

- MacFaddin, Jean. 2004. Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana de importancia clínica. Tercera Edición. Editorial medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2003. Brock. Biología de los Microorganismos. Décima edición. Editorial Pearson, Prentice Hall. México D.F., México.
- Maldonado, J. 2008. Aplicación de modelo matemático predictivo para la determinación de incrustaciones en pasteurizadores a placas en la industria láctea. Tesis de ingeniería. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Marquis, R., Sim, J., Shin, S. 1994. Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. *J. Appl. Microbiol.* **70**:40-48
- Mason, J., Setlow, P. 1986. Evidence for an essential role for small, acid-soluble, spore proteins in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to ultraviolet light. *J. Bacteriol.* **167**: 174-178.
- Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2002. Bioquímica. Tercera Edición. Pearson Education.
- McLellan, M.R. and Splittstoesser, D.F., Reducing risk of *E. coli* in apple cider, *Food Technol.*, 50(12), 174, 1996.
- Medina, E., Romero, C., Brenes, M. and De Castro, A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* **70**: 1194–1199.
- Mendieta, J., Olarte, M., González, H. 2012. Diseño de un sistema de control inteligente para un pasteurizador tipo túnel. *Prospect.* **10**: 81-88
- Mentz, G., Vriesekoop, M., Zhu, B., Aldred, P. 2010. The growth and survival of food-borne pathogens in sweet and fermenting brewers' wort. *International. J Appl Microbiol.* **140**: 19-25.

- Merck, 2012. Bactident oxidase para detección de la cltocromooxidasa en microorganismos. Merck KGaA. Darmstadt, Alemania.
- Morano K, Liu P, Thiele D. 1998 .Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:197–203
- Mossel, D., Ingram, M. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J Appl Microbiol.* **18**: 232-268.
- Neves, M., François, J. 1992. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **288**:859–864
- Ng, H., Bayne, H., Garibaldi, J. 1969. Heat resistance of *Salmonella*: The uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775W. *Appl. Microbiol.* **17**:78-82.
- Nicholson, W., Munakata, N., Horneck, G. Melosh, H., Setlow, P. 2000. Resistance of *bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol R.* **64**: 548-572.
- O’connor-Cox. E., Yiu, P., Ingledew, W. 1991. Pasteurization: Thermal Death of Microbes in brewing. *MBAA Technical quarterly.* **28**: 67
- Ohkuni K, Hayashi M, Yamashita, I. 1998. Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:623–631
- Parish, M.E. (1997). Public health and non-pasteurised fruit juices. *Critical Reviews in Microbiology*,**23**(2), 109–19.
- Parish, M.E., Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in a salmonellosis outbreak, *J. Food Proc.*, 61(3): 280.284, 1998.
- Pflug,L. 1987. Calculating FT-Values for Heat Preservation of Shelf-Stable, Low-Acid Canned Foods using the Straight-Line Semilogarithmic Model1 *J. Food Proc* 50 (7): 608-615.

- Powell, J., Strange, R. 1953. Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. *Biochem. J.*, **54 (2)**: 205-209
- Querol, A., Fleet, G. 2006. Yeast in food and beverages. Editorial Springer, Berlin, Alemania.
- Ramírez, D. 1999. Resistencia térmica de las esporas de *Clostridium sp.* en una bebida carbonatada no alcohólica. Informe de Pasantía para Licenciatura. Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- Ray, B. 1996. Fundamental food microbiology. Editorial CRC Press. Primera edición Florida, E.U.A
- Reverón, I. 1997. Resistencia térmica de microorganismos en cerveza y estudios del proceso de pasteurización. Tesis de magister en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- Riebeling, V., Thauer, R., Jungermann, K. 1975. The interior alkaline pH gradient sensitive to uncouplers and ATPase inhibitors in *Clostridium pasteurianum*. *Eur.J. Biochem.* **55**: 445-453.
- Sand, F., Van Grinsven, A. 1976. Comparison between the yeast flora of Middle Eastern and Western European soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek* **42**: 523-532.
- Scott, W. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* **7**:83-127.
- Sherman, J., Holm, G. 1922. Effects in bacterial growth II: The growth of *bact.coli* in relation to H-ion concentration. *J Bacteriol.* **7**: 465-470.
- Sheth, N.K., Wisniewski, T.R. and Franson, T.R. 1988. Survival of enteric pathogens in common beverages: An *in vitro* study. *American Journal of Gastroenterology* **83**: 658–660.
- Shull, J., Cargo, G., Ernst, R. 1963. Kinetics of Heat Activation and of Thermal Death of Bacterial Spores. Universidad de Syracuse, New York, USA.

- Singer, M., Lindquist, S. 1998. Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding In Vitro and In Vivo. *Mol. Cél.* **1**: 639–648.
- Smis, S., Brul, S. 2005. Stress tolerance in fungi — to kill a spoilage yeast. *Current Opinion in Biotechnology* **16**:225–230
- Sperber, W., Doyle, M. 2009. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Editorial Springer, New York, E.U.A.
- Sperber, W., Doyle, M. 2009. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Editorial Springer, New York, E.U.A.
- Splittsoesser, D.F., McLellan, M.R. and Churney, J.J. (1996). Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Food Protection* **59**(3), 226–9.
- Steen, D., Ashurst, P. 2006. *Carbonated soft drink: Formulation and Manufacture*. Blackwell Publishing, Primera Edición, IOWA, USA.
- Stratford M. and James S.A. (2003). Non-alcoholic beverages and yeasts. In: Boekhout, T. and Robert, V. (eds). *Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects*, pp. 309–45. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
- Stumbo, C. 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*. Editorial Board, Segunda Edición, E.U. A.
- Swan, T., Watson, K. 1998. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiology Letters*. **169** 191-197
- Talaro, K., Chess, B. 2015. *Foundation in microbiology*. Novena Edición editorial McGraw Hill Education.

- Ten Brink, N., Otto, R., Jansen, U., Konings, W.N. 1985. The effect of external pH and lactate concentration on the H⁺/lactate stoichiometry during lactate excretion from glycolyzing *Streptococcus eremoris* cells. *J.Bacteriol.* **162**: 383-390.
- Thomas, R. 1995. Bicarbonate briefly CO₂-free. *Nature* **374**:597–598
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 1992. MICROBIOLOGY An introduction. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Cuarta Edición, California, E.U. A.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2013. Microbiology An introduction. Editorial Pearson, Decimoprimer Edición, California, E.U. A.
- Tournasa, V.H., Heeresb, J., Burgessb, L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food microbiology* **23**: 684–688.
- Townsend, C. T., Esty, J. R., y Baselt, F. C. 1938. Heat-resistance studies on spores of putrefactive anaerobes in relation to determination of safe processes for canned foods. *J Food Sci.***3**: 323-346.
- Tribst, A.A., Sant'Ana Ade, S. and de Massaguer, P.R. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices--past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, **Vol. 35**: 310-339.
- Van de Guchte, M., Serroni, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S., Maguin, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 187–216.
- Williams, I., Robertson, W. 1954. Studies on heat resistance. VI. Effect of temperature of incubation at which formed on heat resistance of aerobic thermophilic spores. *J Bacteriol.* **63**: 377-378.

- Wodzinski, R., Frazier, W. 1961. Moisture requirements of bacteria II: Influence of Temperature, pH, and Malate Concentration on Requirements of *Aerobacter aerogenes*. **81**: 353-358.
- York G, Heil jj, Marsh G, Ansar A, Merson R, Wolcott T, Leonard S.1975. Thermobacteriology of canned, whole, peeled tomatoes. *J. Food. Sci.* **40**:764–769.
- Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. 2003. Food preservation techniques. Woodhead Publishing Limited, Primera Edición, Florida, E.U.A.

9. ANEXOS

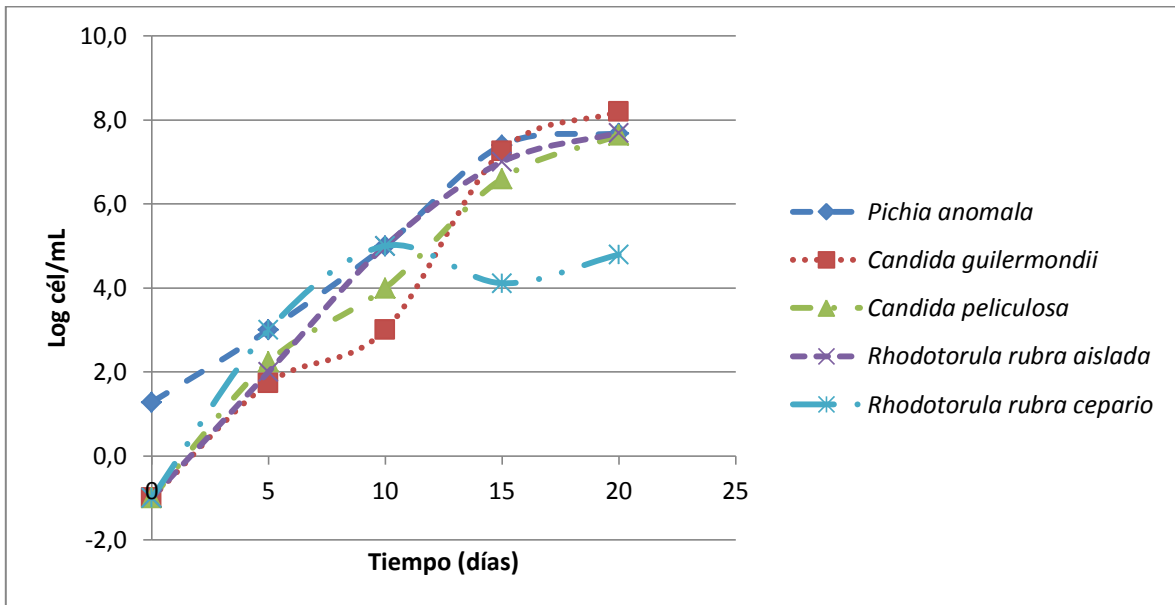


Figura 22. Comportamiento de distintas levaduras inoculadas en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,1 cél/mL.

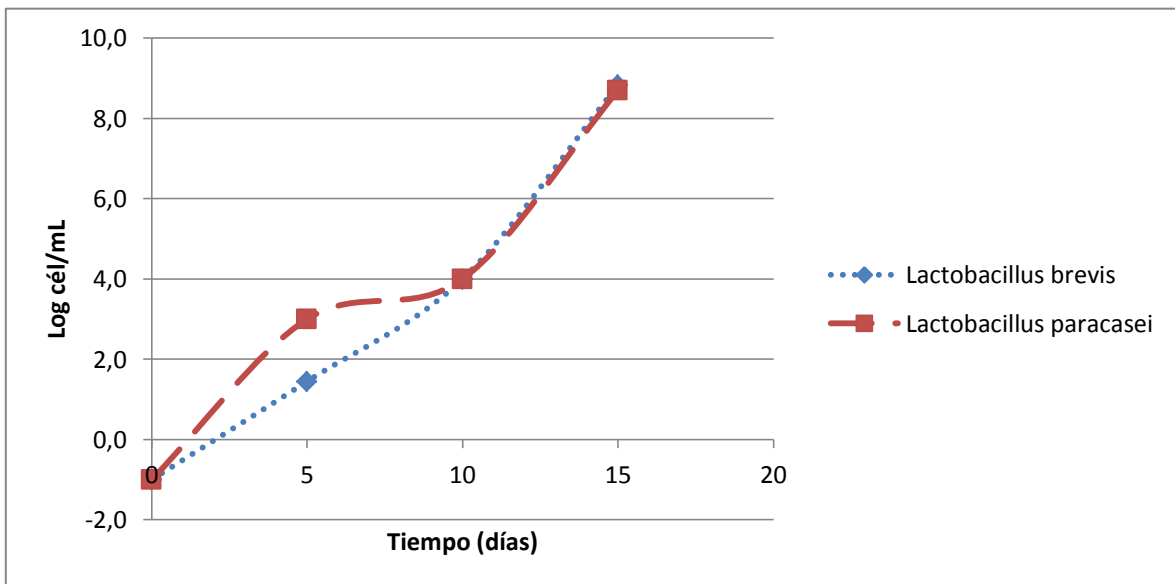


Figura 23. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,1 cél/mL.

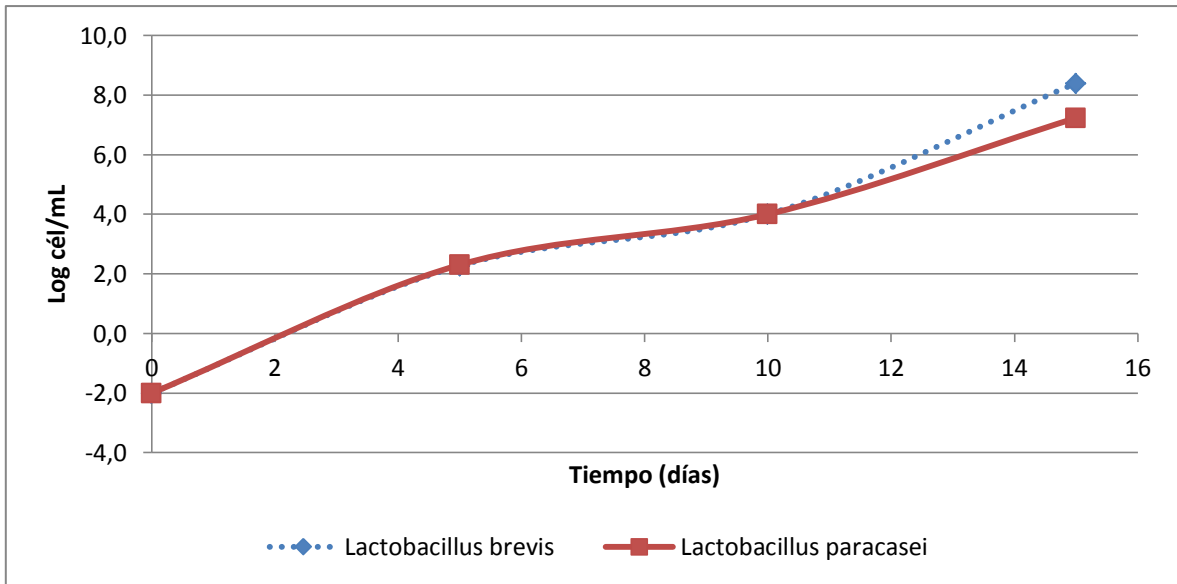


Figura 24. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 0,01 cél/mL.

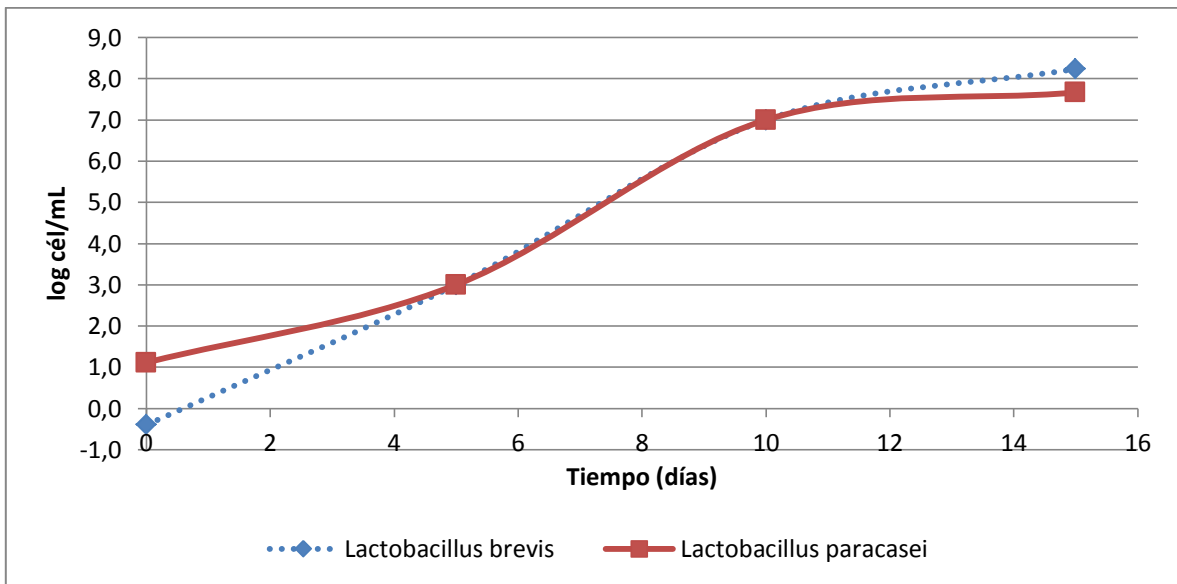


Figura 25. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 10 cél/mL.

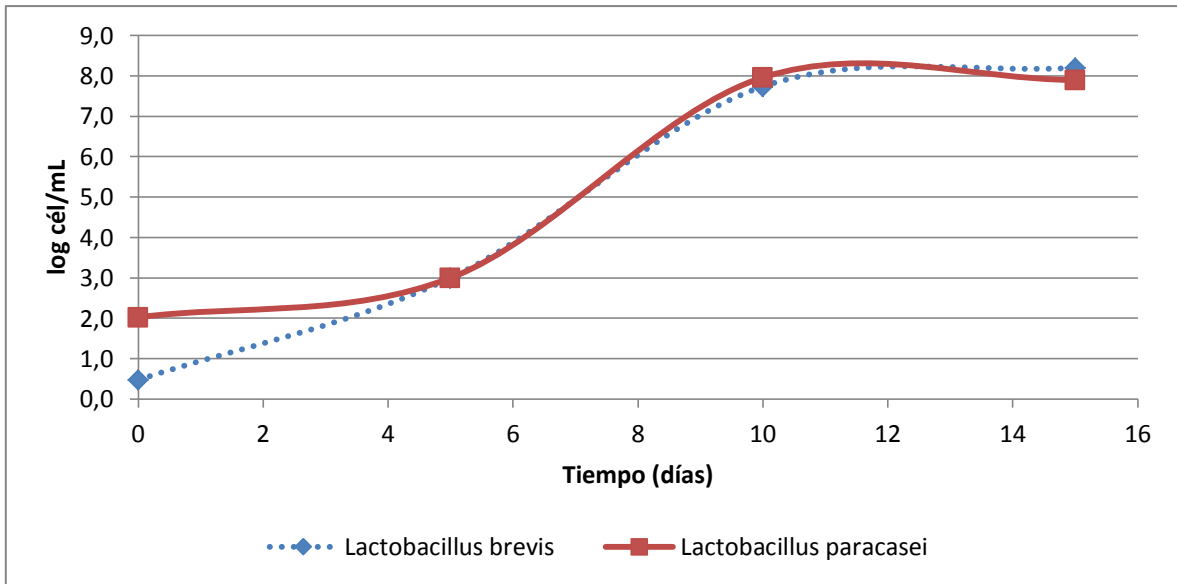


Figura 26. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 100 células/mL.

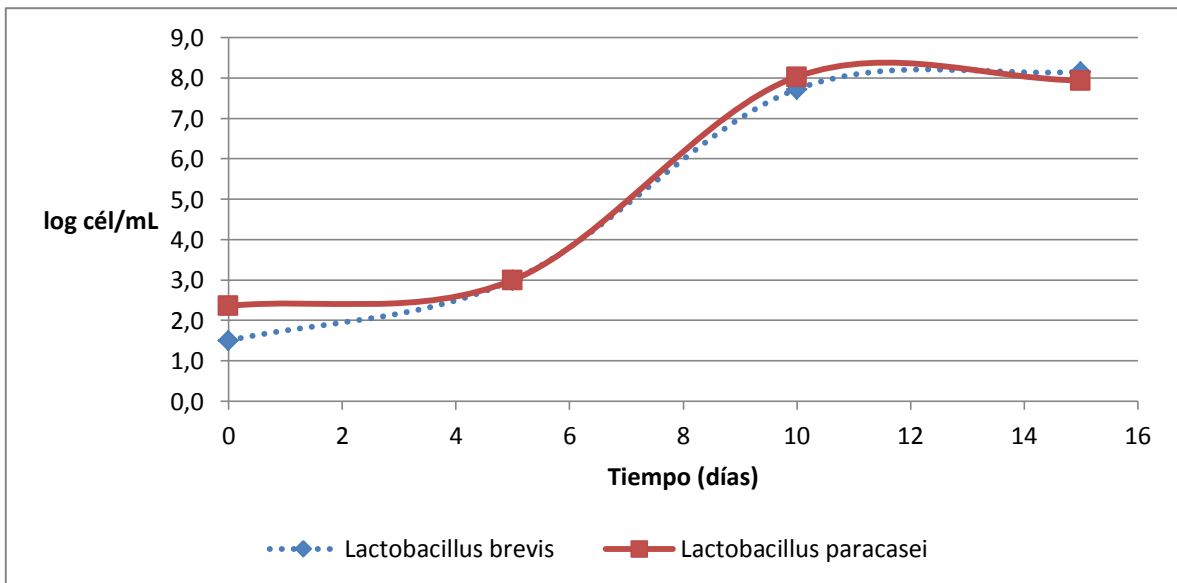


Figura 27. Comportamiento de BAL en una bebida a base de malta, en el tiempo; partiendo de una población de 1000 células/mL.

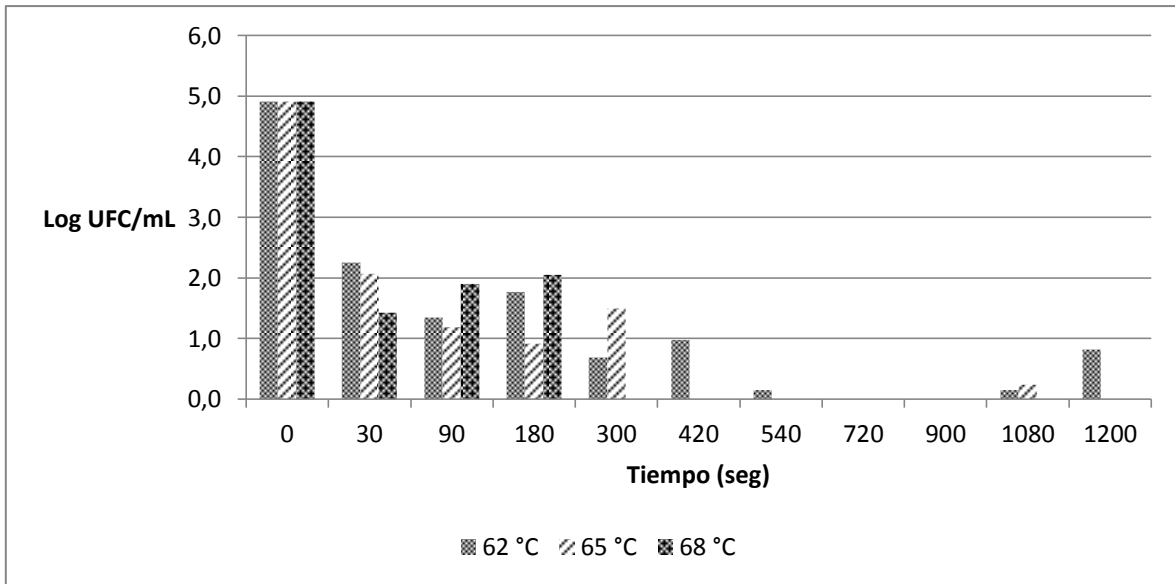


Figura 28. Resistencia de *Rhodotorula mucilaginosa*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.

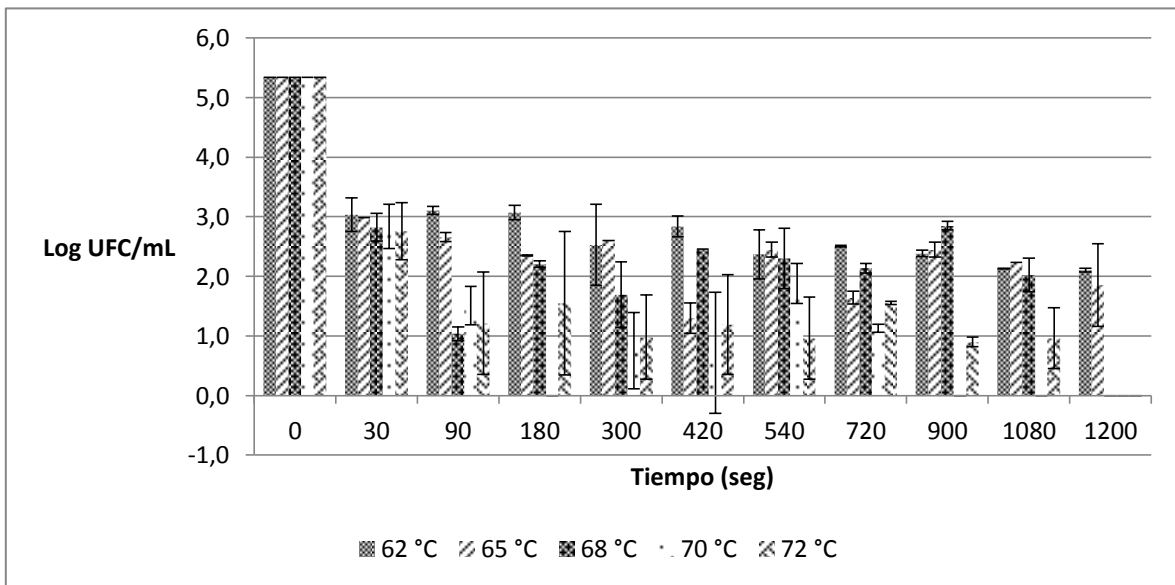


Figura 29. Resistencia de *Pichia anomala*, sometida a diferentes combinaciones de tiempo y temperatura.