



**Universidad**  
Zaragoza



MÁSTER DE INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso 2012-2013

PROYECTO FIN DE MÁSTER

***Termo-inactivación de E. coli,  
en zumo de manzana, en  
condiciones anisotérmicas***



Memoria presentada por

**Noemí Bervis S.**

Director: Prof. Santiago Condón Usón

D. Santiago Condón Usón, catedrático del área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, de la Universidad de Zaragoza

Certifica:

Que el trabajo titulado: “Termo-inactivación de *E.coli*, en zumo de manzana, en condiciones anisotérmicas”, de la que es autora Dña Noemí Bervis, ha sido realizado bajo su dirección y cumple las condiciones requeridas para su defensa como trabajo fin de Máster de iniciación a la investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste, firmo, en Zaragoza, a 20 de junio de 2013

**Fdo: Prof. S. Condón.**

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 PROBLEMÁTICA DE LOS ZUMOS DE FRUTAS.....	3
1.2. CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR CALOR .....	5
1.2.1. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA.....	5
1.2.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA TERMORRESISTENCIA MICROBIANA. ....	8
1.3. LA PASTERIZACIÓN DE LOS ZUMOS: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA CALIDAD.....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. SUSENSIONES MICROBIANAS. ....	17
3.2 MEDIOS DE TRATAMIENTO .....	20
3.3. TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	21
3.4 INCUBACIÓN Y RECUENTO DE SUPERVIVIENTES.....	23
3.5 DETECCIÓN DE DAÑOS SUBLETALES.....	26
3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS. ....	27
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
4.1. TERMORRESISTENCIA DE <i>E. COLI</i> EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS.....	29
4.2. INACTIVACIÓN DE <i>E. COLI</i> EN CONDICIONES ANISOTÉRMICAS.....	35
4.3. SENSIBILIZACIÓN DE <i>E. COLI</i> AL CALOR EN ZUMO DE MANZANA. ....	41
<b>5. CONCLUSIONES:</b> .....	<b>44</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>45</b>

## ABSTRACT

It has been demonstrated that apple juice can be a vehicle for transmission of food poisoning, which makes pasteurization recommended before its commercial distribution. Current heat treatments are usually calculated from heat resistance data obtained in isothermal conditions, while the industrial processing is usually based on the application of anisothermal heating. This extrapolation can cause major errors because there is strong evidence that during anisothermal treatments adaptive phenomena and / or sensitization of the cells to heat may occur. The objective of this study was to determine whether the data obtained under isothermal conditions could predict the rates of inactivation at anisothermal conditions and, in case that was not possible, to quantify the differences and to explore the causes. For this study we use the K12 strain from the KEIO collection (BW25113) to facilitate future studies on the mechanisms of death, injury and adaptation to heat.

The results obtained allowed us to conclude that the heat resistance parameters deduced from isothermal treatments are not adequate to reliably predict the rate of inactivation in anisothermal conditions. Prediction errors increased with heating rate: the higher the rate the lower the  $D_T$  value and the greater the apparent  $z$  value.

The lack of coincidence between the predicted and the experimental values was due to a sensitization of cells to heat as they were resuspended in apple juice. This sensitization was greater the higher the exposure time, and faster and greater the higher the temperature

## RESUMEN

Se ha demostrado que el zumo de manzana puede ser vehículo de transmisión de diversas toxiinfecciones alimentarias, lo que hace recomendable su higienización antes de la distribución comercial. En la actualidad los tratamientos suelen calcularse a partir de datos de termorresistencia obtenidos en laboratorio en condiciones isotérmicas, mientras que el procesado industrial normalmente se basa en la aplicación de calentamientos anisotérmicos. Esta extrapolación puede ser causa de importantes errores porque existen pruebas fehacientes de que durante los tratamientos anisotérmicos pueden producirse fenómenos de adaptación y/o sensibilización de las células al calor. El objetivo de esta investigación fue determinar si los datos obtenidos en condiciones isotérmicas permitían predecir los ritmos de inactivación en condiciones anisotérmicas y, en caso de no permitirlo, cuantificar las diferencias y explorar las causas. Para el estudio decidimos utilizar la cepa K12 de la colección KEIO (BW25113) para facilitar futuros estudios de los mecanismos de muerte, daño y adaptación al calor.

Los resultados nos han permitido concluir que los parámetros de resistencia deducidos de tratamientos isotérmicos no son adecuados para predecir con fiabilidad el ritmo de inactivación en condiciones anisotérmicas. Los errores de predicción aumentaban con el ritmo de calentamiento: cuanto mayor era el ritmo menor era el valor  $DT$  y mayor el valor  $z$  aparente.

La falta de coincidencia entre predichos y experimentales se debía a una sensibilización al calor de las células al ser calentadas en zumo de manzana. Esta sensibilización era tanto mayor cuanto mayor era el tiempo de exposición, y más rápida y mayor cuanto más alta era la temperatura.

# 1. INTRODUCCIÓN

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales desafíos para la Salud Pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. Cada año, la OMS recibe informes sobre la aparición de cientos de casos de ETA en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos contaminados con agentes biológicos. La OMS estima que cada año se producen 1.500 millones de episodios de diarrea que ocasionan unos 3 millones de muertes en menores de 5 años. Se calcula que, dependiendo de los países, del 15 al 70% de esos casos son causados por alimentos contaminados con microorganismos (WHO, 1997).

El tipo de microorganismo implicado en las ETA puede variar ampliamente, así como el tipo de alimento que los vehicula. Hasta hace poco tiempo se suponía que el consumo de zumos de frutas, por su bajo pH, no podían ser causa de toxiinfecciones alimentarias, pero en los últimos años se ha demostrado su indiscutible implicación en algunos brotes. Los zumos de frutas son uno de los alimentos más populares en toda Europa, Estados Unidos y Japón, debido a sus agradables propiedades sensoriales (Komthong, Igura, y Shimoda, 2007). El zumo de manzana es uno de los más consumidos en los países desarrollados, siendo únicamente superado por el del zumo de naranja.

## 1.1 PROBLEMÁTICA DE LOS ZUMOS DE FRUTAS.

Las principales causas de las alteraciones de los zumos son debidas a los microorganismos y a reacciones químicas diversas. Los distintos procesos bioquímicos son catalizados por un gran número de enzimas de constitución que deben ser inactivados para que el alimento no pierda sus propiedades organolépticas originales. Sin embargo, se pueden dar casos en los que la actividad bioquímica este bien controlada, pero que la acción microbiana persista y provoque alteraciones posteriores (Holdsworth, 1987). En el aspecto microbiano las principales alteraciones que tienen

lugar en derivados de frutas son las debidas a fermentaciones, causadas en su mayoría por levaduras, aunque también algunas bacterias y mohos pueden originar modificaciones no deseadas en estos productos. En circunstancias especiales pueden producirse también otras alteraciones químicas mediadas por reacciones diversas, pero en los derivados de frutas son las de pardeamiento no enzimático las que más importancia tienen. Estas reacciones producen modificaciones en el color durante el procesado de los zumos y durante su almacenamiento posterior (Mariné, 1982). Esta evolución del color se produce principalmente por reacciones de caramelización, debidas a la degradación del ácido ascórbico, y por reacciones de Maillard, un complejo grupo de reacciones que dan como resultado la formación de compuestos pardos denominados genéricamente melanoidinas.

Los zumos de manzana se caracterizan por su acidez y alto contenido en azúcares fermentables, lo que los hace especialmente susceptibles a la acción de mohos y levaduras. En algunos casos también se ha observado la alteración de zumos por el crecimiento de lactobacilos y más recientemente por el de algunos formadores de esporos del género *Alicyclobacillus*. Hasta hace relativamente poco tiempo se asumía que el bajo pH de los zumos, inferior a 4,5, impedía la multiplicación de los microorganismos patógenos. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado la supervivencia de distintas especies patógenas por largos periodos de tiempo. Otro tipo de contaminación biológica son las toxinas producidas por los mohos.

A pesar de que el pH ácido de los zumos puede inhibir varios agentes patógenos transmitidos por los alimentos (Kumar et al, 2009.) otros, tales como *E. coli O157: H7*, pueden sobrevivir en este entorno y producir ETA. Por ejemplo, el consumo de zumo de manzana se ha relacionado con al menos 10 brotes toxiinfecciosos por *E. coli O157: H7* entre 1995 y 2005 en los Estados Unidos (Molina et al., 2005 y Vojdani et al., 2008). Otros autores (Cody et al., 1999) afirman que el consumo de zumos de fruta contaminados ha estado implicado en los últimos diez años en al menos 28 toxiinfecciones. De estas 28, un 40%, se han asociado con *Salmonella* spp, y el 30% aproximadamente, con *Escherichia coli* enteropatógenos, especialmente *E. coli O157: H7*. Estas toxiinfecciones han hecho dudar de la seguridad de los zumos de fruta no pasteurizados, lo que llevo a la “Food and Drug Administration (FDA)” norteamericana a emitir una serie de regulaciones para el procesado de zumos de frutas, que incluía la

exigencia de un tratamiento tecnológico capaz de garantizar 5 ciclos de inactivación del microorganismo patógeno más termorresistente de entre los que habitualmente contaminan estos productos (FDA, 2001). En la actualidad, los tratamientos térmicos (pasteurización por calor) se consideran la tecnología más efectiva para eliminar las células vegetativas patógenas que contaminan los zumos.

## **1.2. CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR CALOR**

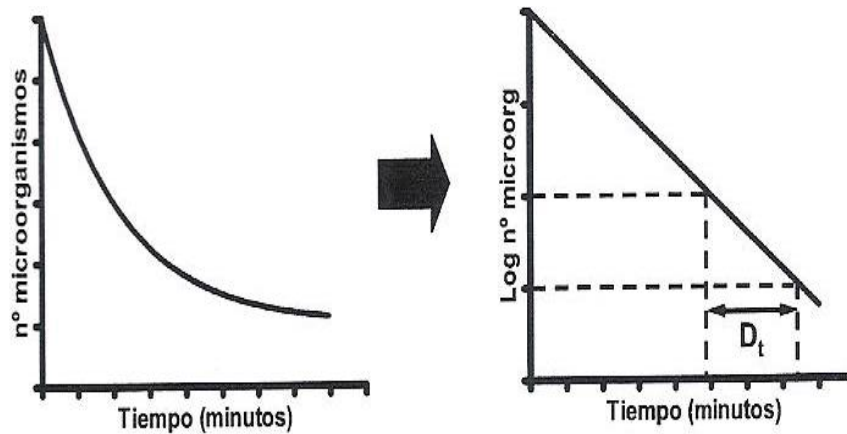
Los métodos tradicionales de conservación, tales como la congelación, pueden mostrar cierta actividad bactericida, sin embargo no se consideran como métodos de elección para la higienización de los alimentos puesto que su eficacia letal es imprevisible. El calor tiene muchas ventajas frente a estos métodos ya que no solo inactiva microorganismos, sino que lo hace de una forma previsible. Esta circunstancia abre la posibilidad de calcular los tratamientos para conseguir el nivel de inactivación deseado. Los parámetros críticos de los tratamientos térmicos son el tiempo y la temperatura, que además interactúan, de manera que es posible calcular tratamientos de eficacia letal equivalente a distintas temperaturas. Además, esta interacción hace posible optimizar los tratamientos térmicos maximizando su eficacia bactericida y minimizando sus efectos sobre la calidad.

### **1.2.1. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA**

En los estudios realizados por Bigelow y Esty (1920) se concluyó que a intervalos iguales de tiempo, a temperatura constante, se destruye un porcentaje fijo de la población microbiana; es decir, que el número de microorganismos supervivientes frente a un tratamiento térmico es una función exponencial del tiempo. Por lo tanto, si en lugar de representar el número de microorganismos frente al tiempo de tratamiento representamos su logaritmo obtendremos una gráfica con perfil recto, denominada gráfica de supervivencia



A partir de la gráfica de supervivencia puede deducirse el valor  $D_T$ , o tiempo de reducción decimal, definido como el tiempo en minutos a la temperatura "t" que es preciso tratar a la población microbiana para reducir el recuento un ciclo logarítmico; o lo que es lo mismo, para que la gráfica de supervivencia atravesase un ciclo logarítmico. Matemáticamente  $D_T$  es el inverso negativo de la pendiente de la gráfica de supervivencia.



**Figura.1** Efecto del tiempo de tratamiento en la supervivencia microbiana al calor: graficas de supervivencia.

Gould (1989) explica la cinética exponencial de inactivación microbiana por el calor basándose en principios termodinámicos; según él, la cinética de muerte sería una simple extensión de las ecuaciones de Arrhenius. Para admitir esta hipótesis es preciso admitir que la inactivación térmica de los microorganismos es un fenómeno del tipo todo/nada y que la muerte es consecuencia de la alteración de una única molécula clave. Esta teoría también asume que todas las células muestran la misma termorresistencia y que la muerte es un fenómeno probabilístico debido a una distribución de energía de tipo Boltzman en las moléculas del medio de tratamiento. Otros autores (Withell, 1942), atribuyen esta cinética a la existencia de una distribución de resistencia entre las células de la población, sobre las que el calor actuaría de manera similar y uniforme.

En cualquier caso, admitiendo esta cinética, el efecto de esterilización puede calcularse mediante la ecuación.

$$F_t = D_T * (\log N_o - \log N_t)$$

Donde,

- $F_t$ : Tiempo de tratamiento a una temperatura "t"

- $D_T$  : tiempo de reducción decimal del microorganismos a la temperatura “t”
- $N_0$ : número inicial del microorganismos en la población.
- $N_t$ : número de microorganismos que sobreviven tras un tiempo “t” de tratamiento.

La cinética de inactivación térmica de otros alterantes de la calidad, como los enzimas, es semejante a la de los microorganismos y puede justificarse con idénticos argumentos. En este caso se asume que la inactivación de las enzimas se debe a cambios estructurales de las moléculas que producen pérdidas de la actividad catalítica; en otras palabras, que en la mayor parte de las enzimas el calentamiento provoca una desnaturalización irreversible. (San Martín, 1996). Cada enzima, como cada microorganismo, tiene una temperatura óptima de actuación, usualmente entre 30 y 40°C, y por encima de 60°C la mayoría se desnaturalizan. Muchos tratamientos térmicos industriales, especialmente de vegetales, se dirigen a la inactivación enzimática (Heimann, 1980).

De entre los numerosos métodos que se han utilizado para estudiar la termorresistencia de los microorganismos y enzimas, dos sobresalen por encima de los demás. El primero, muy próximo a la concepción industrial, consiste en medir, después de un tratamiento térmico establecido, la probabilidad de crecimiento/no crecimiento de un volumen determinado de producto. Se trata pues de un análisis que permite evaluar el número más probable de supervivientes; o dicho en otras palabras, una forma de calcular el tiempo de tratamiento preciso para garantizar un determinado número de ciclos logarítmicos de inactivación. Este método se conoce como “de punto final”. El segundo método consiste en medir directamente, con una técnica apropiada, la supervivencia de una población microbiana a lo largo del tiempo de tratamiento. Se trata de un análisis de tipo "frecuencia de supervivientes" (Bidan, 1986) y se conoce como método de las gráficas de supervivencia. Ya en 1921 Bigelow estudió las variaciones relativas de los dos parámetros: "temperatura" y "tiempo de tratamiento" para conseguir un mismo efecto fisiológico, y definió el tiempo de destrucción térmica (TDT) - método de punto final- a la vez que establecía la relación logarítmica que existe entre el TDT y la temperatura de calentamiento. La inversa negativa de la pendiente de la línea TDT es lo que se conoce como valor z, que se define como el número de grados que es preciso aumentar la temperatura para reducir el tiempo de tratamiento diez veces.

La relación entre el tiempo y la temperatura de tratamiento también puede deducirse de la relación entre los valores  $D_T$  y la temperatura, lo que se conoce como línea de termodestrucción. El valor  $z$  es, también en este caso, la inversa negativa de la pendiente de la línea de termodestrucción, y se define como el número de grados que es preciso aumentar la temperatura para reducir el valor  $D_T$  a la décima parte. A partir de la gráfica de supervivencia puede deducirse el valor  $D_T$ , o tiempo de reducción decimal, definido como el tiempo en minutos a la temperatura "t" que es preciso tratar a la población microbiana para reducir el recuento un ciclo logarítmico; o lo que es lo mismo, para que la gráfica de supervivencia atraviese un ciclo logarítmico. Los valores  $D_T$  y  $z$  definen la termorresistencia de una especie microbiana y su conocimiento permite calcular, ajustar y optimizar los tratamientos térmicos. Aunque se han observado excepciones, todavía hoy se admite que el orden de la termodestrucción es esencialmente logarítmico (Brown y Melling, 1971; Stumbo, 1973), lo que permite estudiar la evolución de una población microbiana en función de la temperatura de tratamiento para un tiempo de exposición dado, o en función del tiempo para una temperatura establecida.

### **1.2.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA TERMORRESISTENCIA MICROBIANA.**

Existen un gran número de factores que afectan a la termorresistencia microbiana por lo que resulta difícil encontrar una clasificación de uso generalizado. En este apartado solo se hace mención a aquellos que mayor efecto parecen ejercer, a juzgar por la bibliografía consultada.

**La termorresistencia microbiana** varía muy ampliamente en la naturaleza. La principal diferencia se encuentra entre las células vegetativas y los esporos bacterianos, cuyos valores  $D_T$  pueden cambiar más de 10 billones de veces. Dentro de las células vegetativas las levaduras suelen ser las más termosensibles, seguidas de las bacterias y los mohos. Entre las células vegetativas las Gram negativas suelen ser menos termorresistentes que las Gram positivas y las células bacilares menos que las cocoides. No obstante, los factores fenotípicos suelen ejercer una influencia tan grande que normalmente enmascaran estas diferencias genotípicas. La tabla 1 muestra, a modo de ejemplo, algunos valores de termorresistencia de distintas especies microbianas.

Muchos microorganismos no esporulados responsables de la alteración de los alimentos son considerablemente más termorresistentes que los patógenos no esporulados, por lo que, normalmente, un tratamiento que elimine los microorganismos alterantes también destruirá a los patógenos.

**Tabla 1.** Valores  $D_{62}$  (células vegetativas y levaduras),  $D_{102}$  (esporos) y  $z$  de diferentes especies microbianas en fase estacionaria (células vegetativas) o esporos, en tampón McIlvaine de pH 7,0. Temperatura de crecimiento: 37°C (células vegetativas) y 28 °C (levaduras). Temperatura de esporulación: 35°C (esporos).

Vegetativas y levaduras	DT (minutos)	Z (°C)	Referencia
<i>Aeromonas hydrophila</i> <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	5,8	Pagan, 1997
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,34	5,8	Pagan, 1997
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,17	5,1	Pagan, 1997
<i>Enterococcus faecium</i>	7,10	6,0	Pagan y col., 1999
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,08 <sup>b</sup>	4,6	Mañas, 1999
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,04	5,0	Mañas, 1999
<i>Salmonella senftenberg</i>	0,040	5,0	Mañas, 1999
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> 173	0,24	3,85	Garza y col., 1994
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> 325	0,03	3,33	Garza y col., 1994
<b>Esporos</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	1,70	9,2	Palop, 1995
<i>Bacillus licheniformis</i>	2,20	6,8	Palop, 1995
<i>Bacillus coagulans</i>	1,30	8,6	Palop, 1995

<sup>a</sup>: temperatura de crecimiento a 35°C

<sup>b</sup>:  $D_{61}$

**Fase de crecimiento.** Las células en fase exponencial de crecimiento suelen presentar una menor resistencia frente al calor que las que se encuentran en fase estacionaria (Martínez y col., 2003; Todd col., 1993). También se ha descrito que en fase de latencia la células presentan una mayor termorresistencia que en la fase exponencial, incluso llegando a superar la de las células en fase estacionaria (White, 1951 1953; Lemcke White, 1959). En la actualidad se pueden atribuir estos cambios al aumento de la

expresión de los factores sigma de fase estacionaria: sigma B en Gram positivas, y sigma S en Gram negativas (Price, 2000; Ntorom, 2004).

**Temperatura y medio de cultivo.** Otro factor determinante de la termorresistencia es la temperatura de incubación del cultivo. La termorresistencia de todos los esporulados parece estar influenciada por la temperatura de esporulación; normalmente si la esporulación se produce a la temperatura óptima, o superior, su termorresistencia será apreciablemente mayor. Las formas vegetativas presentan el mismo comportamiento general que las esporuladas (Schmidt, 1957; Stumbo, 1973; Tomlins y Ordal, 1976; Beaman y Gerhardt 1986). Estas diferencias en termorresistencia de células obtenidas a diferentes temperaturas hacen recomendable mantener las materias primas a temperaturas de refrigeración cuando posteriormente van a ser tratadas térmicamente. Con ello se evitará el desarrollo de formas más termorresistentes que posteriormente disminuirán la eficacia del tratamiento térmico (Sherman et al., 1929; Theophilus y Hammer, 1938).

La composición del medio de cultivo también tiene un efecto importante sobre la termorresistencia de las células, pero los efectos de diferentes componentes, solos o en combinación, son tan variables que hacen muy difícil sacar conclusiones generales.

**El pH del medio de tratamiento** es quizás el factor que de un modo más importante afecta a la termorresistencia. La resistencia térmica de los microorganismos es generalmente máxima a valores de pH próximos a la neutralidad, entre 6,0 y 8,0, y decrece cuando el pH se hace más ácido o más alcalino (Montville y Sapers, 1981; Rodrigo et al., 1990; Condón et al., 1992). Splittstoesser et al., (1975) estudiaron el efecto del pH sobre la termorresistencia de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y otra de *Lactobacillus fructivorans* aisladas del velo del vino. Los autores no encontraron efectos significativos del pH sobre la termorresistencia de *S. cerevisiae*; mientras que *L. fructivorans* resultó más termosensible a pHs ácidos. Otros autores, en cambio, también han observado que las levaduras son menos termorresistentes en medios más ácidos (Deveze y Ribereau-Gayon, 1977).

**Actividad de agua.** La reducción de la actividad de agua en el medio de tratamiento aumenta considerablemente la termorresistencia, tanto en los esporos como en las células vegetativas, lo que se refleja en la necesidad de utilizar temperaturas de tratamiento más elevadas o tiempos más prolongados. Trabajando sobre la influencia de la actividad de agua con *Zygosaccharomyces* spp. se ha demostrado que la

termorresistencia de sus células vegetativas estaba más influenciada por la actividad de agua que la de sus esporos. También se ha demostrado que cuanto más baja es la actividad de agua del medio de tratamiento menores son las diferencias en termorresistencia entre las células vegetativas y los esporos bacterianos (Jermini y Schmidt Lorenz, 1987).

**Composición del medio de tratamiento.** Además del pH y de la aw, muchos componentes del zumo pueden influir en la resistencia térmica de los microorganismos. Algunos de los más significativos son el contenido en azúcares, los conservantes alimentarios, la concentración y el tipo de ácidos orgánicos y las sales (Gibson, 1973; Corry, 1976; Beuchat, 1981b; 1982a; 1987). La mayoría de los autores están de acuerdo en que concentraciones altas de azúcar protegen a las levaduras contra la inactivación térmica. Gibson (1973) atribuyó el aumento de termorresistencia de *Saccharomyces rouxii* y *Torulopsis globosa* en medios con alta concentración de azúcar a la deshidratación de las células y a la reducción del tamaño de los poros de su pared celular. También Beuchat (1982a) encontró que cinco cepas de levaduras, tratadas en cinco zumos de fruta (albaricoque, manzana, uva, naranja y piña) con un 30 y un 50 % de azúcar añadido, eran más resistentes en los zumos más azucarados.

Además del contenido en azúcar también el tipo de azúcar es importante. Corry (1976) estudió la termorresistencia de *S. Rouxii* en soluciones de diferentes azúcares y encontró los tiempos de reducción decimal mayores en soluciones de sacarosa, valores intermedios en soluciones de sorbitol, y los más bajos en soluciones de glucosa y fructosa. Stecchini y Beuchat (1985) estudiaron la influencia de distintos azúcares en la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de melocotón y encontraron que la presencia de sacarosa, glucosa y fructosa tenían un efecto protector. Se ha demostrado que la presencia de ácido cítrico juega un papel importante en la resistencia térmica de las levaduras alterantes de zumo de naranja (Juven et al., 1978). El ácido sórbico reduce la termorresistencia de *Aspergillus niger* pero en cambio parece no tener efecto sobre *Penicillium thomii* (Shibasaki y Tsuchido, 1973).

También se han realizado trabajos en los que se ha estudiado el efecto combinado del tratamiento térmico y la adición de conservantes, bien solos o en combinación con azúcares (Beuchat, 1982b) o ácidos orgánicos (Beuchat, 1983b). De dichos trabajos se puede concluir que, a idéntico tratamiento térmico, las levaduras son más rápidamente inactivadas en los zumos que contienen benzoato sódico que en aquellos que contienen

sorbato potásico. Así mismo, el efecto letal del benzoato y del sorbato no parece ser afectados por la presencia de altas concentraciones de ácidos orgánicos, pero en cambio, se reduce en presencia de altas concentraciones de sacarosa.

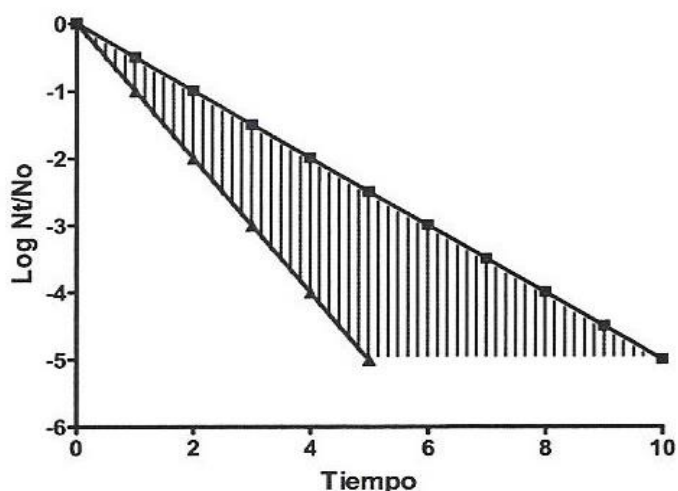
La presencia de sales en el medio de calentamiento también puede afectar la termorresistencia de los microorganismos, aunque no existe consenso acerca de su efecto. La presencia de grasas o aceites ejercen un efecto protector de las células, de forma que, en aquellos alimentos con abundante cantidad de grasas, son necesarios tratamientos térmicos más drásticos.

Otro factor que está indirectamente relacionado con la termorresistencia, y que es preciso tener en cuenta, es la recuperación de las células dañadas tras un tratamiento térmico. La composición de los medios, la adición de solutos o conservantes y la temperatura de almacenamiento inmediatamente después del tratamiento térmico son factores que aparentemente influyen en la supervivencia y en la recuperación de las levaduras dañadas por el calor (Beuchat, 1982b).

**Condiciones de recuperación: Daños subletales.** La exposición de un microorganismo a una determinada tecnología puede dar lugar a su inactivación inmediata, pero también a la aparición de alteraciones en diferentes componentes que, por debajo de un umbral crítico, pueden ser reparadas por la célula. Este tipo de alteraciones dan lugar a células dañadas subletalmente, que pueden reparar las lesiones si las condiciones medioambientales son adecuadas. Su aparición depende de muchos factores, entre ellos, principalmente, del tipo de agente, del tipo de microorganismo y de las condiciones de tratamiento aplicadas.

La detección del fenómeno de daño subletal puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas que incluyen, entre otras (Mackey, 2000): La adición de determinados compuestos inhibidores al medio de recuperación (siembra en ágar selectivos y no selectivos); la observación directa o tras tinción de las células o sus estructuras; el estudio de la fase de latencia de crecimiento; el estudio de la actividad de determinados enzimas; y el estudio de las diferentes funciones celulares. De entre todas estas técnicas, la primera es sin duda la más utilizada, y consiste en comparar los recuentos de supervivientes en un medio no selectivo y en uno selectivo. Al representar el número de microorganismos supervivientes a un determinado tratamiento en ambos medios se obtienen graficas similares a las que están representadas en la figura 2. En esta figura el

área rayada correspondería al porcentaje de la población que ha sufrido daños subletales. Es muy frecuente el uso de un medio selectivo basado en la adición de la concentración máxima no inhibitoria de cloruro sódico (NaCl) que impide la reparación de los daños en la membrana citoplasmática. Comparando los recuentos en los medios selectivos y no selectivos se puede detectar y cuantificar la presencia de células dañadas. De modo similar se pueden añadir al medio de recuperación sustancias como ácidos, bases, o algunos iones inorgánicos para detectar daños en otras estructuras.



**Figura 2.** Efecto del medio de recuperación en la inactivación microbiana. Células recuperadas en medio no selectivo (■) y en uno selectivo (▲). El área rayada representa la parte de la población que ha sufrido un daño subletal (Sacado de Cebrián, 2009).

### 1.3. LA PASTERIZACIÓN DE LOS ZUMOS: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA CALIDAD

Los métodos de conservación tradicionales basados en tratamientos térmicos (escaldado, pasteurización o esterilización) conllevan en muchas ocasiones, como ya se ha comentado, una disminución de la calidad nutricional y organoléptica del alimento. Este aspecto, unido al hecho de que el consumidor demanda alimentos cada vez más frescos y naturales, que además de tener una vida útil prolongada mantengan sus cualidades nutricionales y sensoriales, ha llevado a perfeccionar los tratamientos térmicos existentes, ya que cuanto más intenso es el tratamiento térmico aplicado mayores son los cambios indeseables ocasionados. Por ello, cuando se establecen los



tratamientos térmicos más adecuados para un determinado producto se busca siempre un compromiso entre su calidad microbiológica, organoléptica y nutritiva. Desde el punto de vista de la calidad nutricional cabe destacar que, como consecuencia del tratamiento térmico, se pierden vitaminas termolábiles, como la vitamina C, además de otros compuestos como antocianos y compuestos fenólicos (Klopotek et al., 2005). Klopotek y col. (2005) encontraron una disminución de la capacidad antioxidante total de la fruta como consecuencia del calentamiento. Por otro lado, el uso de temperaturas elevadas favorece las reacciones de pardeamiento no enzimático (Anese et al., 2002) dando lugar a compuestos altamente reactivos que pueden reaccionar con algunas vitaminas, oxidándolas, y producir complejos oscuros que modifican el color, aroma y sabor de la fruta.

Existen referencias de la degradación aerobia de la vitamina C en las cuales, si se aplica calor, se produce el ácido 2,3- dicetogulónico, a partir del cual se producen descarboxilaciones y deshidrataciones formándose finalmente ácido furoico. Este compuesto interviene en la reacción de Maillard, o puede intervenir en condensaciones con otras moléculas de su misma naturaleza dando complejos oscuros; por ejemplo, en zumos donde no se ha eliminado bien el oxígeno.

En la degradación anaerobia de la vitamina C en medios muy ácidos el calor produce el ácido 2-cetogulónico, a partir del cual se produce el furfural, un intermediario de las reacciones de pardeamiento no enzimático, que oscurece el producto. En los zumos, a pesar de estar bien envasados, si hay un pH muy ácido se pueden dar colores oscuros y producirse abombamientos de los envases, ya que se desprende CO<sub>2</sub> en la secuencia de reacciones. Otro parámetro de calidad importante que puede verse modificado por el tratamiento térmico es la viscosidad del zumo. Esta propiedad reológica depende de la cantidad de sólidos totales, la cantidad de sólidos solubles, el tamaño de partícula y la temperatura (Ahmed et al., 2004). El tratamiento térmico puede afectar a estos parámetros, por ejemplo modificando la fracción de pectina soluble presente en la fruta, que cambia la viscosidad del producto (Dutta et al., 2006). Por otra parte, durante el almacenamiento en refrigeración, la actividad residual de los enzimas de constitución también puede influir en el comportamiento reológico del producto.

Los tratamientos térmicos se consideran un método tradicional y efectivo de pasteurización de los alimentos. La USFDA reconoce la eficacia de pasteurización

térmica para la higienización y conservación de los zumo de fruta refrigerados (Donahue, Canitez, y Bushway, 2004, Federal Register [FR], 2001). Sin embargo, los efectos indeseados del calor sobre la calidad de los zumos han llevado a la Tecnología de los Alimentos a realizar un enorme esfuerzo para el desarrollo de métodos alternativos de conservación e higienización de los alimentos.

Por una parte, se intentan mejorar en lo posible los actuales tratamientos térmicos buscando métodos más eficientes de calentamiento, como los microondas, el calentamiento óhmico, etc, y por otra a buscar nuevas tecnologías físicas, no-térmicas, de inactivación microbiana, tales como las altas presiones, los pulsos eléctricos, etcétera. También se intentan combinar diversas tecnologías que permitan reducir la intensidad de los tratamientos y, de esta forma, sus efectos sobre la pérdida de calidad (por ejemplo la adición de ácidos permite reducir la temperatura y el tiempo de esterilización de algunos alimentos). Estos procesos combinados pueden diseñarse tomando como base tanto las tecnologías tradicionales como las nuevas tecnologías. Por ejemplo, se ha sugerido la combinación de altas presiones hidrostáticas (APH) (Balasubramaniam y col., 2001; Roberts y Hoover, 1996), pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAV) (Liu y Col., 1997, Smith y Col.2002; Elez-Martínez *et al.*, 2004), ultrasonidos (Pagan y Col., 1998, 1999) e irradiación (Hausam y Col., 2002; Outtara y Col., 2002; Niemira,2001) con pH ácido y calor. También se ha recomendado su combinación con antimicrobianos (Morgan y Col., 2000, Masschalck y Col., 2001; Arce-Garcia y Col., 2002), e incluso la combinación de varias de estas nuevas tecnologías: ultrasonidos y altas presiones (Raso y Col., 1998a y b, Pagan y Col., 1998); ultrasonidos y pulsos eléctricos (Jin y Col., 1998), altas presiones y pulsos eléctricos (Knorr, 2001), etcétera. De todas estas combinaciones de las nuevas tecnologías parece que su combinación con el calor es la que normalmente resulta más efectiva y de más fácil transferencia al sector industrial.

Los mecanismos a través de los cuales las combinaciones de tecnologías aumentan su eficacia bactericida son diversos, y en muchos casos todavía no bien conocidos. Sin embargo, en muchos casos la complementariedad entre tecnologías se basa en la aparición de daños subletales; en otras palabras: en muchos casos una de las tecnologías daña estructuras celulares, lo que sensibiliza a las bacterias a la otra tecnología. De ahí el interés en conocer la cinéticas de daño y reparación celular de las distintas tecnologías.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

Se ha demostrado que el zumo de manzana puede ser vehículo de transmisión de diversas toxiinfecciones alimentarias, lo que hace recomendable su higienización antes de la distribución comercial.

Los zumos son alimentos especialmente sensibles al calor por lo que es necesario ajustar y optimizar los tratamientos térmicos. En la actualidad los tratamientos suelen calcularse a partir de datos de termorresistencia obtenidos en laboratorio en condiciones isotérmicas, mientras que el procesado industrial normalmente se basa en la aplicación de calentamientos anisotérmicos. Esta extrapolación puede ser causa de importantes errores porque existen pruebas fehacientes de que durante los tratamientos anisotérmicos pueden producirse fenómenos de adaptación y/o sensibilización de las células bacterianas al calor. Por el momento apenas si existen datos en la bibliografía sobre la termoinactivación microbiana en procesos anisotérmicos.

Por otra parte, es posible que en algunos casos la simple aplicación del calor no sea suficiente para conseguir las suficientes garantías sanitarias sin afectar de forma irreversible la calidad de los zumos; en estos casos sería posible desarrollar procesos combinados alternativos. De los datos publicados puede deducirse que las combinaciones que incluyen el calor a temperaturas moderadas son las más eficaces, seguramente porque los daños infringidos por el calor, aunque insuficientes para inactivar a las células, las sensibilizan frente a las otras barreras. De ahí la importancia de estudiar los fenómenos de daño y recuperación celular.

El objetivo de esta investigación es establecer si los datos obtenidos en condiciones isotérmicas permiten predecir los ritmos de inactivación en condiciones anisotérmicas y, en caso de no permitirlo, cuantificar las diferencias y explorar las causas. Para el estudio decidimos utilizar la cepa K12 de la colección KEIO (BW25113) para facilitar futuros estudios de los mecanismos de muerte, daño y adaptación al calor.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. SUSPENSIONES MICROBIANAS.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la cepa parental de *E. coli* de la colección KEIO (BW25113). Esta cepa es una variante de *E. coli* K12 manipulada en laboratorio para la construcción de mutantes.

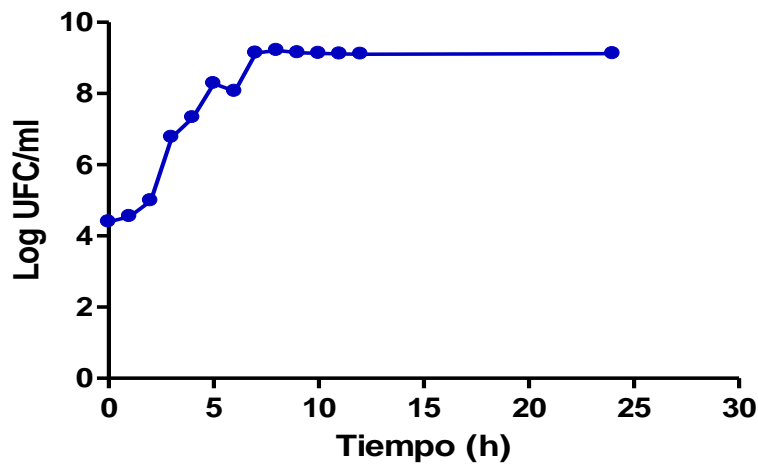
Para preparar las suspensiones de trabajo se inoculaban, a partir de los crioviales almacenados en congelación, placas de agar triptona soja (Biolife, Milan, Italia) enriquecido con un 0,6% (p/v) de extracto de levadura (Biolife)(TSA.YE), por agotamiento en estría, y posteriormente se incubaban a 37°C durante 24 horas. A partir de estas placas se tomaba una colonia que se pasaba a un tubo de precultivo que contenía 7 ml de caldo triptona soja (Biolife) enriquecido con un 0,6% de extracto de levadura (Biolife) (TSB-YE), y se incubaba durante 8 horas a 37°C en agitación, a 135 r.p.m (agitador mod. Rotabit; Selecta, Abrera, España). Tras la incubación se determinaba la concentración celular por recuento microscópico (Nikon, mod. L-kc, Nippon kogaku KK, Japón) en cámara de Thoma, y se inoculaba la cantidad adecuada (aprox 200 microlitros) del precultivo en 100 ml de TSBYE para alcanzar una concentración inicial de  $10^6$  UFC/ml, aproximadamente. Posteriormente se incubaba a 37 °C durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. La Fig. 3. Muestra un esquema general de la metodología seguida para la obtención de las suspensiones. Como es bien sabido la acidificación del medio de cultivo, como consecuencia del metabolismo microbiano, puede inducir la expresión de genes de respuesta al stress que pueden modificar la termorresistencia microbiana. Para evitar estas interferencias se mantuvo constante el pH de medio de cultivo mediante el uso de un titrador automático (titrador mod Crison Buret; Crison).



**Figura. 3** Protocolo de preparación de las suspensiones microbianas (Cebrián, 2009).

Para establecer el tiempo adecuado de incubación para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, momento en que los microorganismos muestran su máxima termorresistencia, se elaboró la correspondiente curva de crecimiento en las condiciones experimentales descritas.

Para elaborar las curvas de crecimiento se extraían, a intervalos predeterminados de tiempo, muestras de 0,1 ml de los frascos en incubación. Tras realizar las correspondientes diluciones decimales, en agua de peptona (Biolofo) al 0,1 % (p/v), se sembraban por duplicado placas de TSA-EL por homogeneización en masa, que se incubaban durante 18-48 horas a 37 °C. El número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) se estimaba a partir de la media de los recuentos obtenidos en las dos placas correspondientes a cada dilución, de al menos dos diluciones decimales consecutivas. Las curvas de crecimiento se elaboraron representando el logaritmo del número de UFC/ml frente al tiempo de incubación. La figura 4. Muestra una curva de crecimiento típica en nuestras condiciones experimentales.



**Figura. 4** Curva de crecimiento de *E. coli* Bw25113 en TSB.YE. Temperatura de incubación 37 °C.

Las curvas de crecimiento se ajustaron, para obtener los parámetros cinéticos, con la ecuación de Gompertz,

$$\text{Log } N_t = N_0 + C e^{\left\{-e^{[-B(t-M)]}\right\}}$$

Dónde:

$N_t$ : número microorganismos al tiempo  $t$  (UFC/ml)

$N_0$ : recuento inicial (UFC/ml)

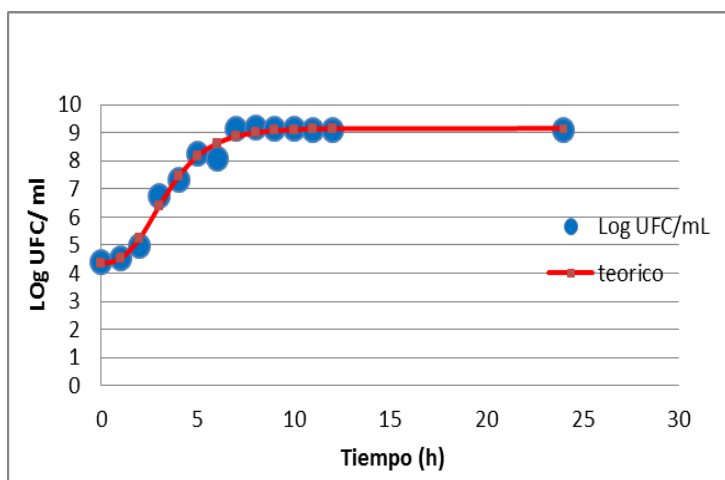
$C$ : log del recuento en la fase estacionaria –  $\log N_0$  (ciclos de incremento en el recuento)

$M$ : tiempo al cual el cultivo alcanza su máxima velocidad de crecimiento (horas)

$B$ : velocidad de crecimiento relativo en el punto  $M$  ( $\text{horas}^{-1}$ )

El ajuste se realizó con la herramienta solver del programa Microsoft Office Excel 2002 (Microsoft Co., Redmond, Washington, E.E.U.U). La figura 5. ilustra el ajuste de los puntos a la curva calculada y la Tabla 1 los parámetros deducidos del modelo.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli*.



<b>N</b>	<b>4,33473105</b>
<b>C</b>	4,8247472
<b>M</b>	2,75971904
<b>B</b>	0,66270307

**Figura. 5** Curva de crecimiento de *E. coli* modelizada con la ecuación de Gompertz.

### 3.2 MEDIOS DE TRATAMIENTO

Con objeto de dar una aplicación práctica inmediata a los resultados, los experimentos se realizaron en zumo de manzana comercial (Auchan lote.L27512) adquirido en un centro comercial de Zaragoza. La composición del zumo, indicada en la etiqueta, se incluye en la Tabla. 2. El zumo tenía un pH de 3.35.

**Tabla. 2.** Composición del zumo de manzana

Valor energético	182 KJ (43kcal)	455 KJ (107 Kcal)	%(p/v)
Proteína	0,2g	0,5g	1%
Hidratos de carbono	10,5g	26,3	9%
azucares	10,3g	25,8	52%

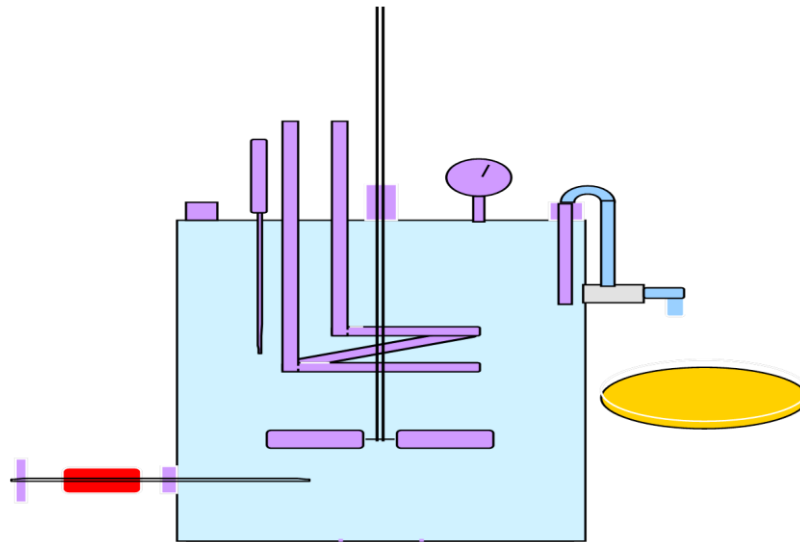
Cuando se consideró conveniente se realizaron experimentos en tampón McIlvaine de pH 3,3 para establecer el efecto de los componentes del zumo en la termorresistencia de *E. coli*. Los tampones se prepararon mezclando soluciones 0,1M de ácido cítrico

(Panreac, Castellar del Valles, España) y 0,2 M de fosfato disódico (Panreac) en la proporciones adecuadas, según el protocolo descrito por Johnson y Lindsay (1939). Una vez preparados los tampones se comprobó su pH (pHmetro mod. Basic 20+, Crison) y, cuando fue necesario, se corrigió hasta el valor deseado añadiendo los volúmenes necesarios de las soluciones de ácido cítrico o fosfato disódico.

### **3.3. TRATAMIENTOS TÉRMICOS.**

Las determinaciones de resistencia al calor se realizaron en un termoresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993) adaptado para la aplicación de rampas de calentamiento en condiciones controladas (Conesa y col., 2009). Como se puede observar en el esquema (figura. 6) y en la fotografía (fig. 7.) este equipo consta de una cámara cilíndrica de tratamiento de acero inoxidable y 400 ml de capacidad, cerrada por la parte superior con una tapa enroscable, también de acero inoxidable. Unidos a la tapa se hallan la resistencia eléctrica -utilizada para el calentamiento del medio-, el sistema de agitación, el sistema de extracción de muestras –controlado mediante una válvula solenoide-, una sonda termopar, un deflector –para mejorar la turbulencia- y el sistema de presurización. El equipo también posee un dispositivo para la inoculación del cultivo –cerrado con un septum de cromatografía-, situado en la parte inferior de la cámara. Durante las determinaciones la presión y la temperatura se controlan, respectivamente, con un manoreductor y un circuito electrónico conectado a la sonda termopar sumergida en el vaso de tratamiento (sonda mod. Thermometer 639K, Crison). El mismo sistema electrónico controla la apertura –tiempo- de la válvula solenoide, permitiendo la recogida de muestras del interior del termoresistómetro.





**Figura. 6** Esquema del Termoresistómetro TR-SC.

Antes y después de cada sesión de trabajo se esterilizaban (5 minutos; 130°C) tanto el equipo como el medio de tratamiento. Una vez estabilizada la temperatura de tratamiento, se inyectaban 0,2 ml de la suspensión microbiana con una jeringuilla (CR-700-200 Hamilton Co., Reno, Nevada, E. E. U. U.) previamente desinfectada y, a intervalos predeterminados de tiempo, se extraían muestras de 0,2 ml directamente en placas de Petri estériles, a las que inmediatamente se añadía el medio de recuperación estéril, fundido y a 45°C. Las placas se homogeneizaban y posteriormente se incubaban.



**Figura. 7** Termoresistómetro utilizado para las determinaciones de resistencia al calor.

Los tratamientos anisotérmicos se aplicaron con ritmos de calentamiento de 2, 5 y 8 °C/min con una temperatura inicial de 30 °C y final de 64 °C. Durante los tratamientos se registraron las temperaturas para verificar el correcto funcionamiento del equipo o, en su caso, efectuar las correspondientes correcciones. Para el diseño de los tiempos de extracción se utilizó una hoja Excel, diseñada al efecto por Alvarez y Condón (comunicación personal), que permite predecir el ritmo de inactivación, a partir de los parámetros de termorresistencia obtenidos en tratamientos isotérmicos, con la ecuación::

$$\text{Log}N_t = \text{Log}N_0 - \left( \frac{Z}{RC} D_{ref} \ln 10 \right) * (10^{(-T_{ref}/z)}) * ((10^{(T/Z)}) - (10^{(T_0/Z)}))$$

Dónde:

$N_t$  es el número de microorganismos en el tiempo  $t$ ,

$N_0$  es el número inicial de los microorganismos,

$D_{ref}$  es el tiempo de reducción decimal a la temperatura  $T_{ref}$ ,

$RC$  es el ritmo de calentamiento,

$T_0$  es la temperatura en el tiempo 0,

$T_{ref}$  es la temperatura de referencia,

$Z$  es el número de grados centígrados que hay que aumentar la temperatura para reducir el  $D_T$  un ciclo logarítmico.

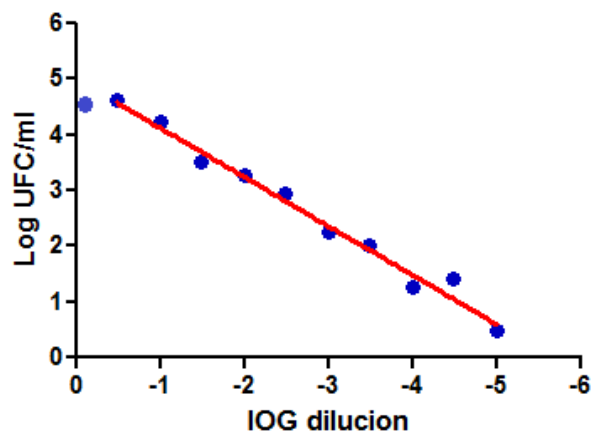
### **3.4 INCUBACIÓN Y RECUENTO DE SUPERVIVIENTES.**

Las muestras extraídas del termoresistómetro se sembraron, por homogenización en masa, en el medio de recuperación seleccionado. Como medio no selectivo se utilizó TSAYE. Estas placas se incubaron durante 24h a 37°C en estufas de cultivo microbiológico (mod. Incubig, Selecta). Tras la incubación se procedió al recuento de supervivientes utilizando un contador automático de colonias por análisis de imagen (Synoptic Ltd, Cambridge UK), según han descrito Condón y col (1996).



**Figura. 8** Izquierda: Estufa de Incubación. Derecha: Contador automático de colonias.

Condón y col (1996) discutieron las ventajas del método de recuento de placas densamente pobladas para la estimación de supervivientes, pero también advirtieron sobre sus limitaciones. Es evidente que el método puede infravalorar la carga microbiana cuando se intentan estimar poblaciones heterogéneas, e incluso en poblaciones de una única especie cuando la carga microbiana es excesivamente alta. Puesto que la concentración máxima de colonias que es posible contar con este método depende de la especie objeto de estudio, decidimos determinar el recuento máximo admisible con nuestra cepa. Para ello se elaboró un gradiente de concentraciones a partir de una suspensión obtenida en las condiciones previamente descritas. Posteriormente, a partir de cada una de las diluciones realizadas se procedió a sembrar 0,1ml en placas de TSA-YE, que se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se contaron en el analizador de imagen descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 9



**Figura.9** Establecimiento del rango de recuento de *E. coli* Bw25113 con el contador de colonias por análisis de imagen. Recuento ( ● ) línea de regresión ( — )

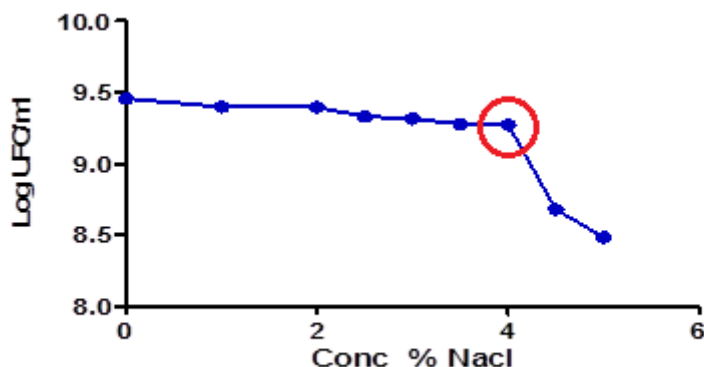
La precisión de los recuentos viene reflejada por el buen ajuste de los puntos a la correspondiente línea de regresión, cuyo coeficiente de correlación es similar al descrito en la publicación original (Condón et al., 1987). La exactitud del método (reflejada por la pendiente de la línea de regresión) también resultó muy satisfactoria entre 30 y 30.000 ufc/ placa. Los recuentos inferiores a 30 ufc/ placa presentaban una mayor dispersión, probablemente porque en poblaciones microbianas de tan baja concentración los volúmenes inoculados en la placa no son representativos. En los recuentos superiores a 30.000 ufc/ placa se producía una subestimación del número de microorganismos, bien por un fenómeno de inhibición o, lo que es más probable, por una saturación del contador por confluencia de las colonias.

En vista de los resultados obtenidos en esta exploración solo se dieron por validos los recuentos de placas con menos de 30.000 colonias. A partir de estos recuentos se construyeron las gráficas de supervivencia representando el logaritmo de la fracción de supervivientes frente al tiempo de tratamiento

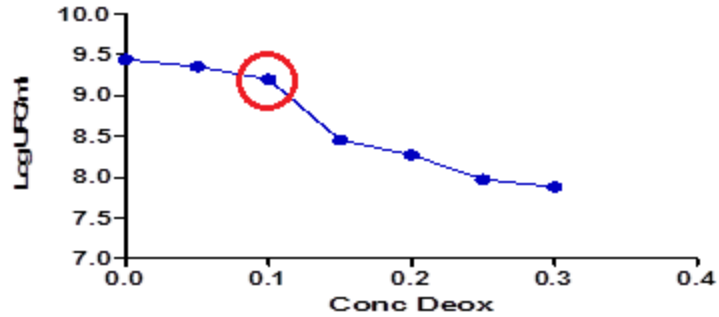
### 3.5 DETECCIÓN DE DAÑOS SUBLETALES.

Para detectar los daños de las envolturas celulares se utilizó la técnica del medio selectivo. Tras los tratamientos las células se cultivaron en un medio no selectivo (TSAYE) y otro selectivo, estimando el porcentaje de células dañadas por comparación de la fracción de supervivientes en ambos medios. Como medios selectivos se utilizaron TSAYE enriquecido con la concentración máxima no inhibitoria de cloruro sódico (TSAYE+SC) o Desoxicolato de sodio (TSAYE+DO). Estos componentes dificultan la reparación de los daños celulares de la membrana plasmática (cloruro sódico) y de la membrana externa (desoxicolato sódico) (Mackey, 2000).

Las concentraciones máximas no inhibitorias de cloruro sódico y desoxicolato son características de la cepa microbiana y pueden cambiar con las condiciones de cultivo; por ello, decidimos determinarlas experimentalmente en nuestras condiciones de trabajo. Para estimar las concentraciones máximas no inhibitorias utilizamos un cultivo en fase estacionaria de crecimiento (24h) que sembramos en placas de TSAYE enriquecidas con concentraciones crecientes de cloruro sódico (1-10%) o desoxicolato sódico (0,05-0,3%). Las placas se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas, tras comprobar que 24 h adicionales de incubación no modificaban significativamente los recuentos. Dado que la precisión de los recuentos microbiológicos es limitada, definimos la concentración máxima no inhibitoria como aquella que no reducía los recuentos más de un 40%. Los resultados del experimento se incluyen en las figuras 10 y 11.



**Figura. 10** Efecto de la concentración de cloruro sódico del medio de cultivo en la estimación de la población celular



**Figura. 11** Efecto de la concentración de Desoxicolato sódico del medio de cultivo en la estimación de la población celular

De las figuras 10 y 11 se deduce que las concentraciones máximas no inhibitorias de cloruro y desoxicolato sódico para *E. coli* Bw25113 son, en nuestras condiciones experimentales, del 4% (p/v) y 0,10 % (p/v) respectivamente.

### 3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Aunque esporádicamente encontramos algunas desviaciones del orden logarítmico de inactivación en condiciones isotérmicas, la mayoría de las gráficas de supervivencia obtenidas en este estudio presentaban un perfil recto por lo que se modelizaron con la ecuación tradicional:

$$\text{Log}_{10} S(t) = -\left(\frac{1}{DT}\right) * t$$

Donde S (t) es la fracción de supervivientes ( $N_t/N_0$ ),  $D_T$  es el tiempo de reducción decimal y “t” el tiempo de tratamiento.

Según hemos indicado previamente el diseño de los experimentos en condiciones anisotérmicas se realizó, a partir de los datos de resistencia -valores  $D_T$  y z- obtenidos en condiciones isotérmicas con la ecuación:

$$\text{Log } Nt = \text{Log} (N_0/10^{Ft/DT})$$

Dónde:

$D_T$  es el tiempo de tratamiento a una temperatura para reducir la población microbiana a la décima parte,

$F_T$ : es el efecto letal acumulado a una temperatura “T” de referencia,

$N_0$  es el número inicial de microorganismos,

$N_T$  es el número de microorganismos que sobreviven tras un tiempo de tratamiento.

Con objeto de comparar cuantitativamente la letalidad de los tratamientos iso y anisotérmicos fue preciso deducir los parámetros  $D_T$  y  $z$  a partir de las curvas de inactivación en condiciones anisotérmicas. Estos parámetros se calcularon con la herramienta “solver” del programa Excel 5.0 (Microsoft) utilizando la ecuación desarrollada por López y col.(1994b):

$$\text{Log } A = \log A_0 - (z / \alpha D_T \text{ ref In}10) * 10^{(-T_{\text{ref}}/z)} (10^{T/z} - 10^{T_0/z})$$

Donde

$N_t$  representa el número de microorganismos al tiempo  $t$ ,

$N_0$  es el número inicial de microorganismos,

$D_{\text{ref}}$  es el tiempo de reducción decimal a la temperatura  $T_{\text{ref}}$ ,

$\alpha$  es el ritmo de calentamiento,

$T_0$  es la temperatura al tiempo 0,

$T_{\text{ref}}$  es la temperatura de referencia,

$Z$  es el número de grados centígrado que hay que aumentar la temperatura para reducir el  $D_T$  un ciclo logarítmico.

Para la representación gráfica de los datos se utilizó el programa Graph PRISM<sup>R</sup> (Graphpad software, Inc., san Diego, California, EE.UU).

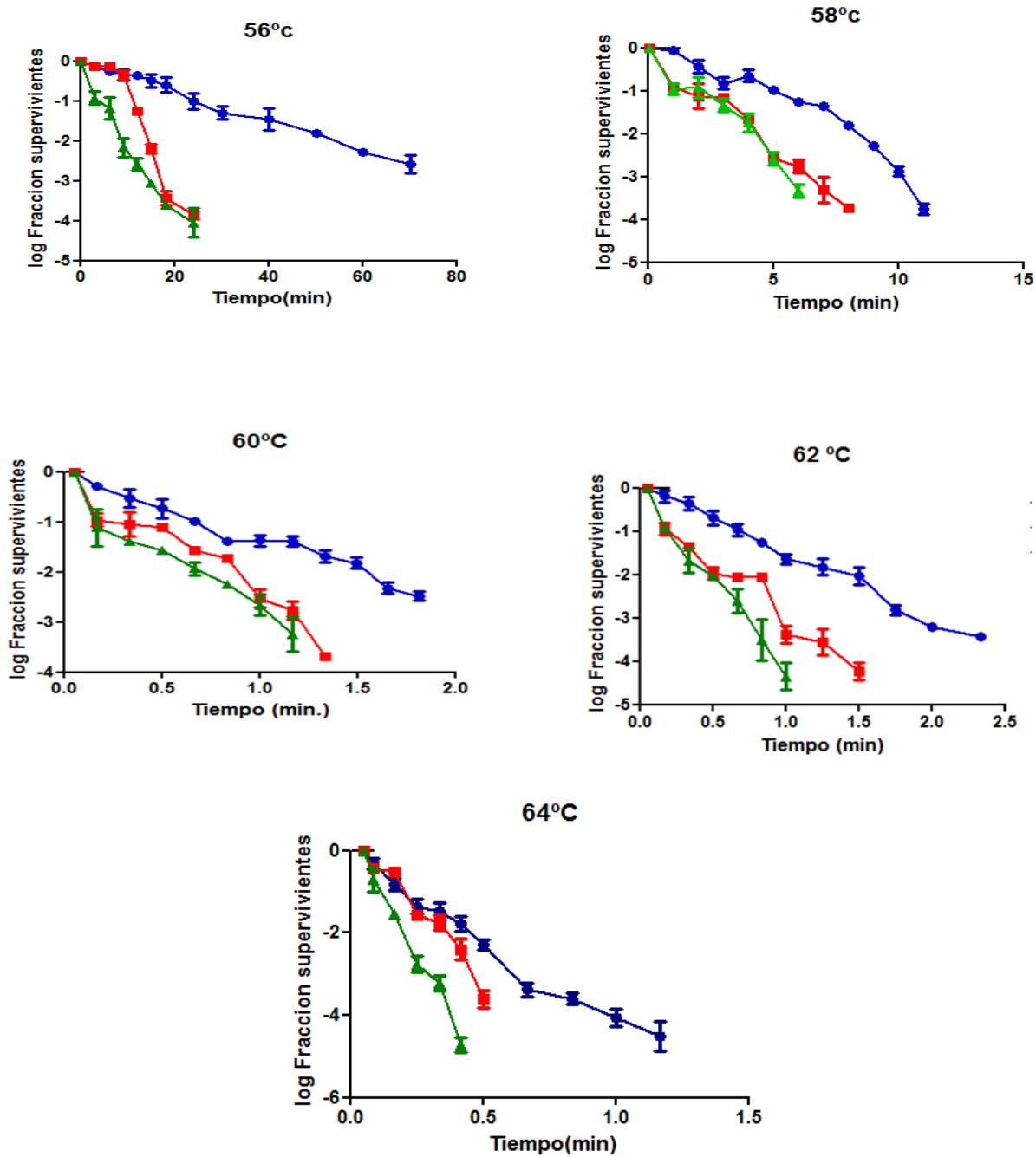
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación hemos determinado la resistencia al calor en condiciones isotérmicas de calentamiento de *E. coli* suspendida en zumo de manzana. A partir de las gráficas de supervivencia hemos establecido las cinéticas de muerte y de daño celular y calculado los parámetros de termorresistencia. Posteriormente hemos aplicado tratamientos anisotérmicos con distintos ritmos de calentamiento y, a partir de las curvas de inactivación, hemos deducido los valores  $D_T$  y  $z$  aparentes. Comparando los parámetros de resistencia obtenidos con ambos métodos hemos observado una falta de acuerdo cuyas causas hemos explorado.

### 4.1. TERMORRESISTENCIA DE *E. COLI* EN CONDICIONES ISOTÉRMICAS.

La figura 13 muestra las gráficas de supervivencia de *E.coli* tratada a 56, 58, 60, 62 y 64°C en zumo de manzana tras la recuperación de los supervivientes en medios no selectivos (TSAYE) y selectivos (TSAYE-SC y TSAYE-DO). Cada punto en la figura representa la media de tres determinaciones realizadas con suspensiones diferentes en días distintos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. Como se observa en la figura ocasionalmente se produjeron desviaciones de la linealidad, mayoritariamente en forma de perfiles sigmoideos y, menos frecuentemente, de hombros. Los perfiles sigmoideos suelen asociarse a fenómenos de adaptación microbiana al estrés durante el propio tratamiento; mientras que los hombros suelen achacarse a fenómenos de daño y recuperación celular. Según algunos autores, durante los primeros momentos del calentamiento los daños infringidos a la célula son fácilmente reparables por lo que el número de supervivientes disminuye lentamente; sin embargo, a medida que se prolonga el tratamiento se supera la capacidad de reparación celular y empieza el curso exponencial de inactivación (Gould.G., 1989; Mackey B.M., 1982). Sin embargo, en nuestras gráficas, estos perfiles no parecían estar relacionados con unas condiciones concretas de tratamiento o recuperación, ni eran en general especialmente marcados por lo que decidimos, para un análisis más simple de los datos, ajustarlas con el modelo cinético tradicional, asumiendo un curso de inactivación exponencial





**Figura. 13** Gráficas de supervivencia al calor de *E. coli*: a diferentes temperaturas. Medio de tratamiento: zumo de manzana. Medios de recuperación: TSAYE, (■), TSAYE-SC, (■), TSA+DO (▲).

A partir del ajuste de las curvas de supervivencia obtuvimos los parámetros de resistencia del microorganismo en las diferentes condiciones experimentales. Los datos se presentan ordenados en las Tablas 4, 5 y 6. En las tablas, además del valor  $D_T$

estimado para cada réplica se incluye el valor medio con su desviación estándar y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones, para ilustrar la bondad de los ajustes. En el peor de los casos obtuvimos un valor  $R^2$  de 0,86, que no es inhabitual en la bibliografía, y en la mayoría de las ocasiones fue superior a 0,95.

**Tabla. 4.** Tiempos de reducción decimal a distintas temperaturas de *E. coli* suspendido en zumo de manzana y recuperado en un medio no selectivo. Las gráficas de supervivencia se ajustaron asumiendo una cinética exponencial.

Medio recuperación	T <sup>a</sup> tratamiento	D <sub>T</sub>	D <sub>T</sub> <sup>-</sup>	DS	R <sup>2</sup>
TSA +YE	56°C	27,624	26,7678	0,8675	0,9803
		25,889			0,9837
		26,789			0,9751
	58°C	7,942	8,4166	0,4413	0,8981
		8,493			0,9303
		8,814			0,9112
	60°C	0,758	0,7865	0,0262	0,9587
		0,790			0,9689
		0,810			0,9701
	62°C	0,606	0,6434	0,0336	0,971
		0,672			0,9888
		0,651			0,9891
	64°C	0,232	0,2349	0,0054	0,9809
		0,231			0,9433
		0,241			0,9818

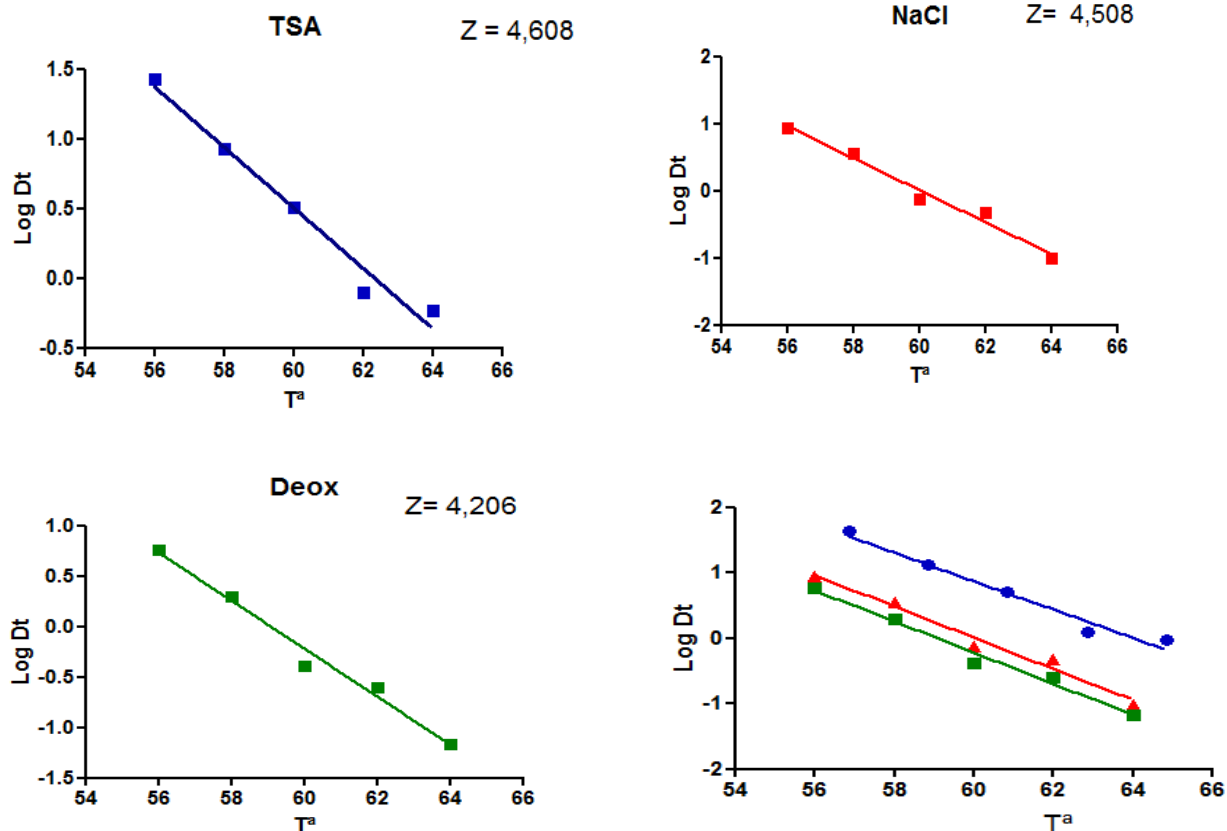
**Tabla. 5** Tiempos de reducción decimal a distintas temperaturas de *E. coli* suspendido en zumo de manzana y recuperado en un medio con la concentración máxima no inhibitoria de cloruro sódico. Las gráficas de supervivencia se ajustaron asumiendo una cinética exponencial.

Medio recuperación	Tª tratamiento	D <sub>T</sub>	D <sub>T</sub> '	DS	R <sup>2</sup>
Selectivo con SC	56°C	5,3590	5,4293	0,0771	0,9025
		5,4171			0,8664
		5,5118			0,9116
	58°C	2,2706	2,2707	0,0276	0,9401
		2,2431			0,9322
		2,2984			0,9381
	60°C	1,9821	2,0997	0,1063	0,9363
		2,1281			0,9278
		2,1890			0,9410
	62°C	0,3882	0,3485	0,0316	0,9423
		0,3921			0,9097
		0,4018			0,9141
64°C	0,3209	0,3940	0,0070	0,8719	
	0,3831			0,8970	
	0,3416			0,9010	

**Tabla. 6.** Tiempos de reducción decimal a distintas temperaturas de *E. coli* suspendido en zumo de manzana y recuperado en un medio con la concentración máxima no inhibitoria de desoxicolato sódico. Las gráficas de supervivencia se ajustaron asumiendo una cinética exponencial.

Medio recuperación	T <sup>a</sup> tratamiento	D <sub>T</sub>	D <sub>T</sub> <sup>-</sup>	DS	R <sup>2</sup>
Selectivo con DO	56°C	6,0277	5,7548	0,2366	0,9474
		5,6053			0,9683
		5,6314			0,9718
	58°C	1,9197	1,9744	0,0673	0,9292
		2,0496			0,952
		1,9541			0,9712
	60°C	0,4124	0,4105	0,0394	0,8974
		0,3702			0,859
		0,4490			0,9010
	62°C	0,2831	0,2499	0,0340	0,9683
		0,2150			0,9658
		0,2516			0,9691
64°C	0,0675	0,0679	0,0190	0,9352	
	0,0872			0,9992	
	0,0491			0,9526	

Con los valores medios incluidos en las tablas 4, 5 y 6 construimos las correspondientes gráficas de termodestrucción (Figura 14), representado los logaritmos de los tiempos de reducción decimal frente a las temperaturas de tratamiento y, a partir de ellas, calculamos los valores z.



**Figura 14.** Gráficas de termodestrucción de *E. coli* Bw2511 tratada en zumo de manzana y recuperada en medios no selectivos (TSAYE) y selectivos (TSAYE-SC y TSAYE-DO). . TSA+ YE (  $\bullet$  ), TSA+ NaCl (  $\blacksquare$  ), TSA+DO (  $\blacktriangle$  ).

El valor z de *E. coli* Bw2511 resultó ser, en las condiciones habituales de tratamiento (calentamientos isotérmicos) y recuperación de supervivientes (TSAYE) de 4,6 °C, muy semejante al obtenidos por otros autores en condiciones de tratamiento semejantes (Mackey, 2000). Además, como se observa en la figura 14, los valores z obtenidos en las diferentes condiciones de recuperación no difirieron significativamente ( $p > 0.05$ ). Esta observación es importante porque indica que la termodependencia de las reacciones que conducen a los daños de la membrana citoplasmática, la membrana externa y la muerte celular es la misma, de lo cual podría deducirse que estos fenómenos están directamente relacionados. Aunque esta afirmación pueda parecer una obviedad, lo cierto es que a día de hoy todavía no se ha establecido una relación directa

entre los fenómenos de daño térmico en las envolturas celulares y la muerte microbiana por el calor.

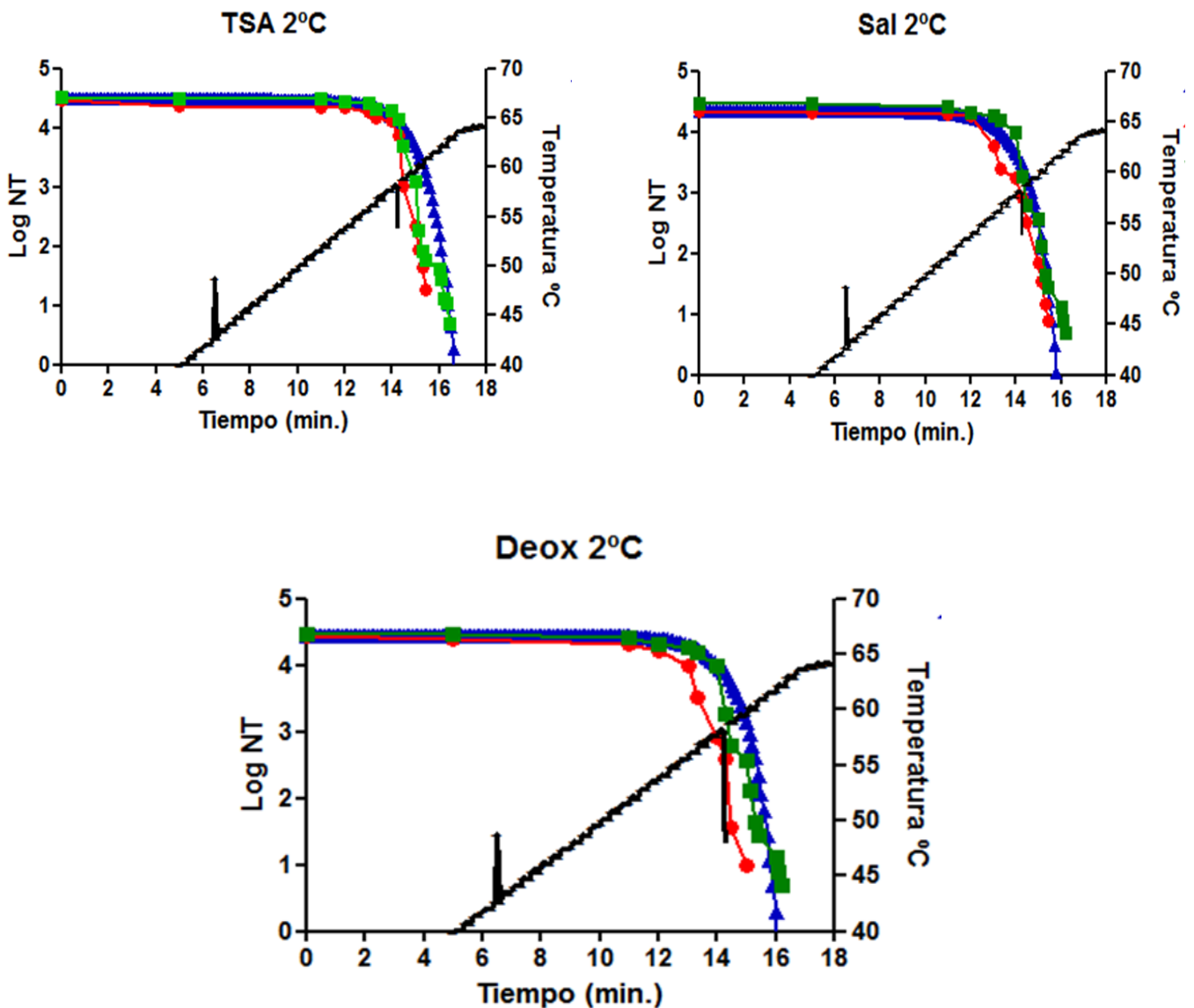
Desde un punto de vista aplicativo estos resultados también tienen interés. Como hemos afirmado en la introducción, muchos procesos combinados se basan en que los daños subletales producidos por unas tecnologías pueden sensibilizar a los supervivientes frente a otras. A este respecto nuestros datos indican que las eventuales ventajas de un proceso combinado que incluya tratamientos térmicos se mantendrán cualquiera que sea la temperatura de tratamiento, obviamente dentro del rango de temperaturas capaces de producir daños subletales. Por ejemplo, como se desprende de la figura 14 si un proceso combinado que incluye el calor se basa en que la otra tecnología inactiva a las células cuyas envolturas se encuentran dañadas térmicamente, la combinación será igual de ventajosa si se aplica a 64 o a 57 °C. A ambas temperaturas el proceso combinado permitiría reducir el tiempo de tratamiento, respecto del térmico a la misma temperatura, unas diez veces.

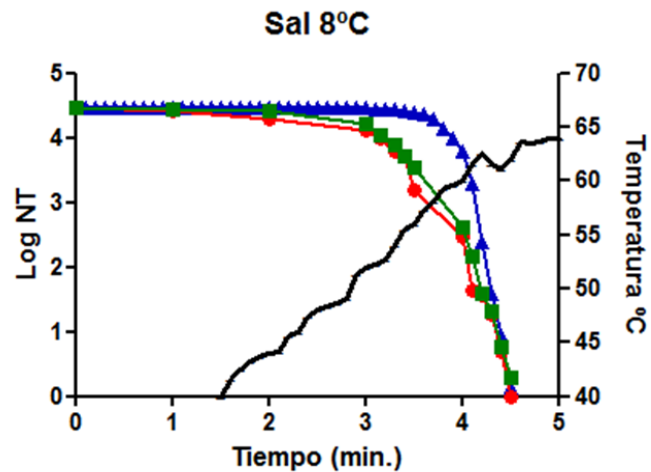
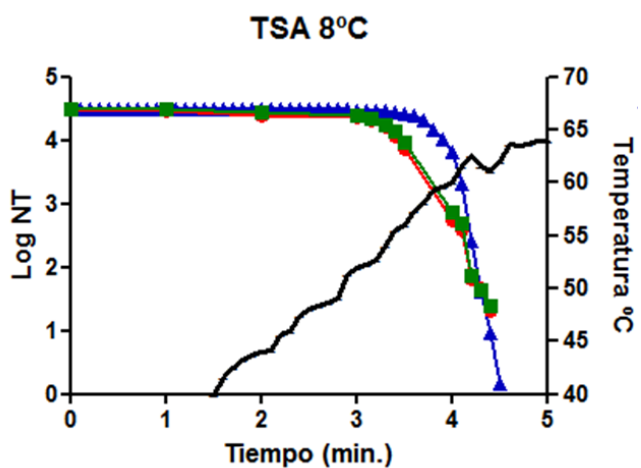
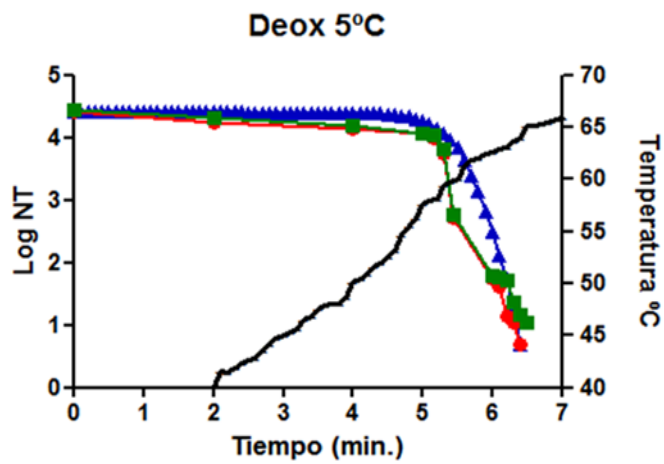
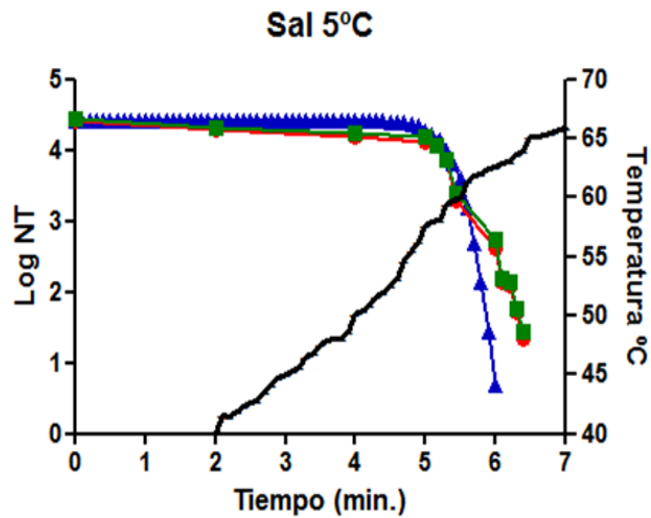
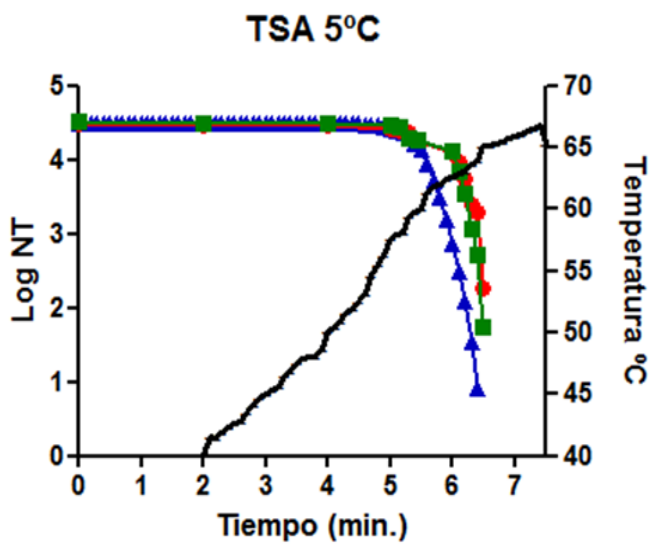
#### **4.2. INACTIVACIÓN DE *E. COLI* EN CONDICIONES ANISOTÉRMICAS.**

La idea de estimar la termorresistencia en condiciones anisotérmicas es antigua. En los años 70 el planteamiento era que a partir de un único experimento sería posible calcular los valores  $D_T$  y  $z$  mediante cálculos matemáticos sencillos (Reichert et al., 1988).

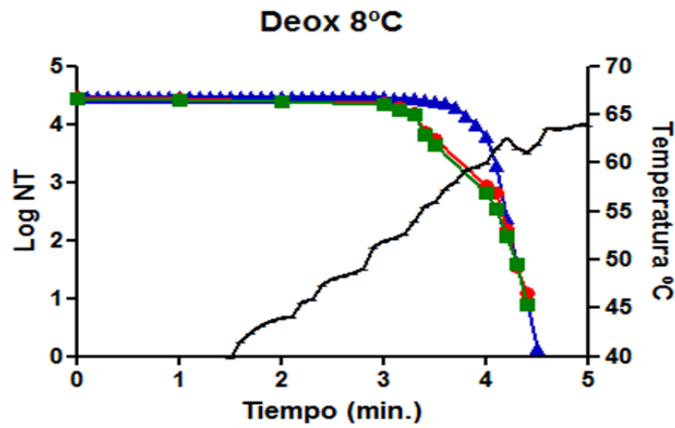
A finales de los años 70 y durante los 80 comenzó a estudiarse la inactivación de células vegetativas en los procesos de pasteurización siguiendo los mismos criterios que hasta entonces se utilizaron para el estudio de la inactivación de esporos en los procesos de esterilización. Este nuevo enfoque permitió observar desviaciones del orden logarítmico de destrucción mucho más marcados y frecuentes y, a partir de estas observaciones, se llegó a demostrar que las células vegetativas podían adaptarse al calor durante el propio tratamiento (Splittstoesser, 1991; Scholte, 1995; Alwazeer y col 2002). En la actualidad se están estudiando los mecanismos moleculares de estos procesos de adaptación. Por tanto, a día de hoy la duda es: ¿Son adecuados los tratamientos anisotérmicos de pasteurización aplicados en la industria, que mayoritariamente se han calculado a partir de datos obtenidos en laboratorio en condiciones isotérmicas.

Para contestar a esta pregunta diseñamos unos experimentos consistentes en someter a *E. coli* a tratamientos anisotérmicos con distintos ritmos de calentamiento. Para calcular adecuadamente los tiempos de muestreo asumimos que los parámetros de resistencia no se veían afectados por el ritmo de calentamiento, circunstancia en la que la inactivación alcanzada sería la suma de la eficacia letal acumulada para cada tiempo. Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la figura 18. Cada una de las gráficas de la figura incluye la curva de inactivación teórica, calculada a partir de los datos de termorresistencia en condiciones isotérmicas, en color azul, y los datos obtenidos experimentalmente en dos réplicas independientes. Para cada ritmo de calentamiento se incluyen los resultados obtenidos incubando los supervivientes en un medio no selectivo y en medios selectivos con cloruro sódico y Desoxicolato









**Figura 18.** Gráficas de inactivación térmica de *E.coli* sometida a tratamientos anisotérmicos con distintos ritmos de calentamiento y recuperadas en distintos medios: Curva teórica ( —●— ), Valores experimentales ( —■— ) ( —▲— ).

Como se observa en las gráficas de la figura 18 existe un ligero desajuste entre los valores predichos y los obtenidos experimentalmente cuando el ritmo de calentamiento era de 2 °C/min. Estos desajustes parecían ir aumentando al acelerar el ritmo de calentamiento. Con objeto de poder cuantificar la magnitud de los cambios decidimos ajustar las curvas de inactivación con la ecuación propuesta por López et al. (1994b). Utilizando la herramienta solver de Excel ajustamos los datos experimentales a la ecuación considerando como variables un valor  $D_T$  de referencia (en nuestro caso el  $D_{56}$ ) y el valor  $z$ . El programa combina ambos valores dando como resultado aquellos que minimizan la suma de los cuadrados de las desviaciones entre teóricos y experimentales. Los resultados de los ajustes se muestran en las tablas 7, 8 y 9.

**Tabla 7.** Valores  $D_{56}$  y  $z$  estimados a partir de la curvas de inactivación en condiciones anisotérmicas con la ecuación de López et al (1994b). Los resultados experimentales se obtuvieron cultivando los supervivientes en TSAYE.

Ritmo calentamiento (°C/min)	$D_{56}$ (min)	$Z$ (°C)
1,94	5,21	4,22
1,96	5,08	4,024
5,39	5,44	7,509
5,38	3,92	8,34
7,41	1,03	9,57
7,45	1,1	9,36

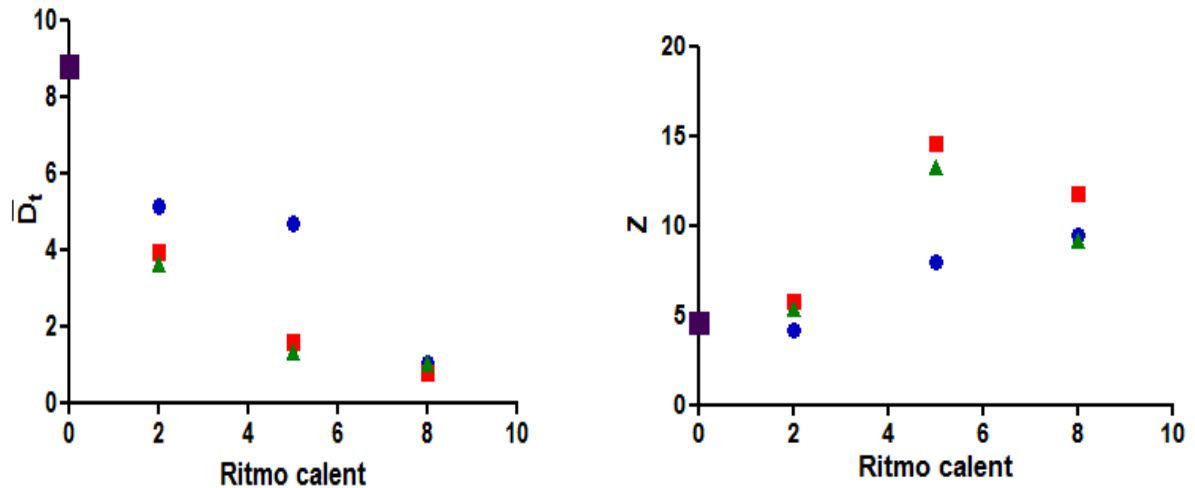
**Tabla 8.** Valores  $D_{56}$  y  $z$  estimados a partir de la curvas de inactivación en condiciones anisotérmicas con la ecuación de López et al (1994). Los resultados experimentales se obtuvieron cultivando los supervivientes en TSAYE-SC.

Ritmo calentD56	Log D56	D56	Log z	z
1,94	0,71683772	5,21	0,62531 245	4,22
1,96	0,70586371	5,08	0,60465 797	4,024
5,39	0,7355989	5,44	0,87558 21	7,509
5,38	0,59328607	3,92	0,92116 605	8,34
7,41	0,01283722	1,03	0,98091 194	9,57
7,45	0,04139269	1,1	1,06	9,36

**Tabla 9.** Valores  $D_{56}$  y  $z$  estimados a partir de la curvas de inactivación en condiciones anisotérmicas con la ecuación de López et al (1994). Los resultados experimentales se obtuvieron cultivando los supervivientes en TSAYE-DO.

Ritmo calentD56	Log D56	D56	Log z	z
1,94	0,71683772	5,21	0,625312 45	4,22
1,96	0,70586371	5,08	0,604657 97	4,024
5,39	0,7355989	5,44	0,875582 1	7,509
5,38	0,59328607	3,92	0,921166 05	8,34
7,41	0,01283722	1,03	0,980911 94	9,57
7,45	0,04139269	1,1	1,06	9,36

En la fig. 19 se ilustran las relaciones existentes entre los tiempos de reducción decimal y los valores  $z$  estimados con los ritmos de calentamiento. El valor obtenido en los calentamientos isotérmicos se incluye, como referencia, considerando un ritmo de calentamiento de cero. Como se observa en la figura existe una notable dispersión de algunos de los datos obtenidos cuando el ritmo de calentamiento es de 5 °C/min. Dada



**Figura 19:** Relación de los valores  $D_{56}$  y  $z$  aparentes con el ritmo de calentamiento. En el eje de ordenadas se incluye el valor calculado en calentamientos isotérmicos. Medios de recuperación: TSA+ YE ( ● ), TSA+ NaCl ( ■ ), TSA+DO ( ▲ ).

la magnitud de estas dispersiones y el escaso número de ritmos de calentamiento aplicados no creemos prudente realizar afirmaciones sobre la cinética de los cambios, pero sí se ven tendencias evidentes e indiscutibles: Los valores  $D_{56}$  aparentes disminuyen al aumentar el ritmo de calentamiento, al contrario que los valores  $z$ , que aumentan.

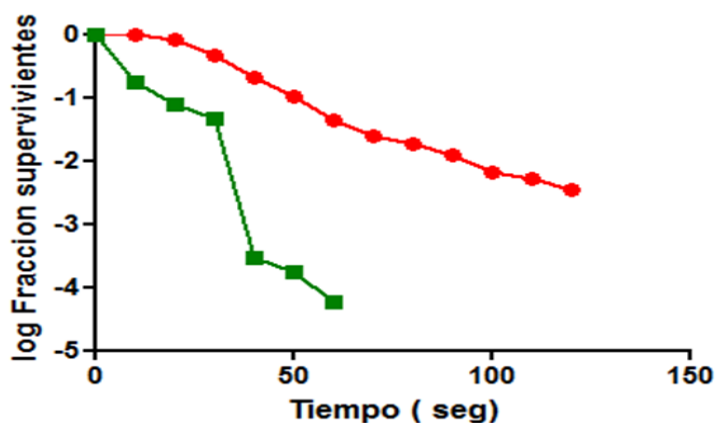
En un sentido estos resultados no son sorprendentes puesto que es bien sabido que, incluso durante los tratamientos, las células pueden adaptarse al calor y a la acidez modificando su termorresistencia. Pero en otro sentido sí lo son. A partir de los datos publicados sería esperable que la termorresistencia aumentase respecto de la obtenida en los calentamientos isotérmicos; además sería esperable que los aumentos fuesen mayores cuanto menores fuesen los ritmos de calentamiento dado que las células dispondrían de más tiempo para adaptarse antes de que la temperatura alcanzase valores letales. Como se observa en la Fig 19 los resultados obtenidos indican exactamente lo contrario: Las células se sensibilizan durante los calentamientos anisotérmicos, y lo hacen tanto más cuanto mayor es el ritmo de calentamiento.

Dado lo inesperado de estos resultados decidimos realizar una pequeña exploración que aportase alguna información sobre las causas de este comportamiento.

### 4.3. SENSIBILIZACIÓN DE *E. COLI* AL CALOR EN ZUMO DE MANZANA.

A partir de los datos presentados en la Fig 19 se deducía que la suspensión de las células en el zumo de manzana no solo no provocaba un aumento de termorresistencia por desarrollo de resistencias cruzadas sino que, de hecho, las sensibilizaba. Para comprobar este hecho procedimos a realizar las determinaciones en el propio zumo de manzana y en tampón McIlvaine del mismo pH. Los resultados se muestran en la figura 20.

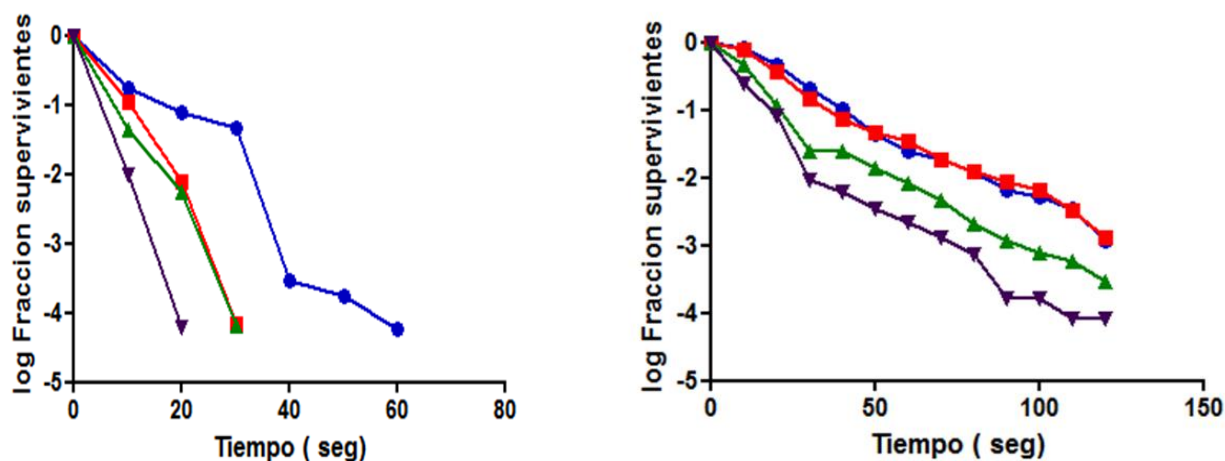
Como se observa en la figura 20, efectivamente la termorresistencia que mostraba el microorganismo era menor en el zumo que en el tampón correspondiente ( $D_T / 2$  aproximadamente).



**Fig. 20.** Gráficas de supervivencia a 58 °C de *E. coli* suspendido en zumo de manzana ( —■— ) y en tampón citrato-fosfato ( —●— ) de su mismo pH.

Es bien sabido que al suspender células vegetativas en medios ácidos suele desencadenarse una respuesta de adaptación al estrés y se ha demostrado que, al menos en ocasiones, esta respuesta adaptativa también las protege frente al calor. Por ello, aunque estos resultados demostraban que efectivamente se producía una sensibilización, surgía la duda si este era el mecanismo responsable de la caída de los valores  $D_T$  aparentes en los calentamientos anisotérmicos. En otras palabras, como en los calentamientos isotérmicos la suspensión se añade al zumo ya precalentado podría ocurrir que la inactivación fuese tan rápida que no permitiese la adaptación. Obviamente la situación podría ser diferente en condiciones anisotérmicas.

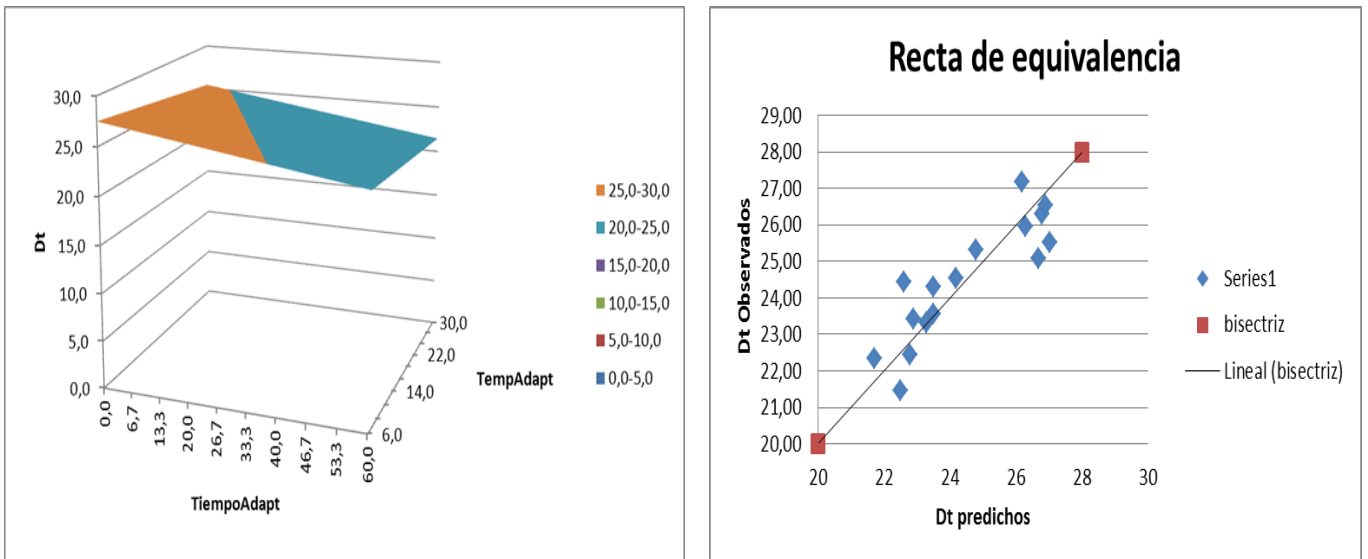
Para comprobar este extremo decidimos estudiar los cambios de termorresistencia en función del tiempo de adaptación de las células al medio de calentamiento. Para ello suspendimos las células en zumo de manzana y en tampón de su mismo pH, y tras mantenerlas distintos tiempos a temperatura ambiente obtuvimos las correspondientes gráficas de supervivencia. Los resultados se resumen en la figura 21.



**Figura 21.** Gráficas de supervivencia a 58 °C de *E. coli* en zumo de manzana (A) y en tampón McIlvaine de su mismo pH (B) tras distintos tiempos de adaptación, a temperatura ambiente, en los mismos medios. Tiempo de adaptación previo al tratamiento térmico: 0 min (●), 10 min (■), 20 min (▲) 6 horas (▼).

Como se observa en la Fig. 21 la suspensión de las células, incluso a temperatura ambiente, en medios de pH 3, 5 produce una sensibilización frente al calor en el mismo medio. Esta sensibilización es tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de adaptación. Por otra parte, el efecto sensibilizador es mayor y más rápido en el zumo de manzana que en el tampón de su mismo pH. Estos resultados explicarían perfectamente que el  $D_{56}$  aparente en los tratamientos anisotérmicos fuese menor que el de los isotérmicos, puesto que la duración de los tratamientos es mayor. Sin embargo, los resultados planteaban una nueva duda: si la sensibilización era mayor porque el tiempo de contacto con el zumo también lo era, ¿por qué la termorresistencia aparente era tanto menor cuanto mayor era el ritmo de calentamiento, y por tanto más cortos? Nuestra hipótesis fue que quizás la magnitud del efecto sensibilizador fuese mayor cuanto mayor fuese la temperatura de exposición. Para comprobar esta hipótesis realizamos un nuevo

experimento usando como variables, además del tiempo (5, 15, 30, 45 y 60 segundos), la temperatura (6 y 30 °C). Una vez obtenidas las curvas de supervivencia calculamos los valores  $D_{56}$  y efectuamos una regresión cuadrática para encontrar las relaciones entre las tres variables.



**Figura 22.** Efecto de las interacciones entre el tiempo y la temperatura de adaptación en la termorresistencia de *E. coli* en zumo de manzana. La figura incluye, además del diagrama de superficie (izquierda), la gráfica de equivalencia (derecha).

La figura 22 ilustra el efecto de las interacciones entre el tiempo y la temperatura de adaptación con la termorresistencia de *E.coli*. La recta de equivalencia indica que los errores de la ecuación se distribuyen aleatoriamente, lo que confiere fiabilidad a las conclusiones extraídas del diagrama de superficie. Este último indica que la termorresistencia disminuye con el tiempo y la temperatura de adaptación y que, como asumía nuestra hipótesis, la sensibilización es más rápida y mayor a temperaturas más altas. Estos resultados indican que muy probablemente la falta de concordancia entre las predicciones de las curvas de inactivación calculadas en tratamientos isotérmicos y los datos experimentales obtenidos en tratamientos anisotérmicos se deben a una sensibilización de las células al ser calentadas en zumo de manzana.

## 5. CONCLUSIONES:

- 1) En nuestras condiciones laborales *E. coli* muestra, frente a los tratamientos isotérmicos, en zumo de manzana, un valor  $D_{56} = 26,76$  y un valor  $z = 4,608$ .
- 2) Mientras que la recuperación de las células en medios selectivos disminuye el valor  $D_{56}$  diez veces aproximadamente, no modifica significativamente el valor  $z$ .
- 3) Los parámetros de resistencia deducidos de los tratamientos isotérmicos no permiten predecir con fiabilidad el ritmo de inactivación en condiciones anisotérmicas.
- 4) Los errores de predicción aumentan con el ritmo de calentamiento. Cuanto mayor es el ritmo menor es el valor  $D_T$  y mayor el valor  $z$  aparentes.
- 5) La falta de coincidencia entre predichos y experimentales se debe a una sensibilización al calor de las células al ser suspendidas en zumo de manzana.
- 6) La sensibilización es tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de exposición al zumo, y más rápida y mayor cuanto más alta es la temperatura.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ Anese, et al., (2002). Effect of equivalent thermal treatments on the color and the antioxidant activity of tomato purees. *Journal of Food Science* 67 (9): 3442-3446.
- ❖ Ahmed, et al., (2004). Colour kinetics and rheology of coriander leaf puree and storage characteristics of the paste. *Food Chemistry* 84 (4): 605-611.
- ❖ Alwazeer et al., (2002). Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed oranges juices. *J. Food Prot.* 65, 1586-1589.
- ❖ BEUCHAT, L. R. (1982b). Effects of environmental stress in recovery media on colony formation by sublethally heat-injured *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78, 536-540.
- ❖ BEUCHAT, L. R. (1983b). Combined effects of food preservatives and organic acids on thermal inactivation of yeasts in fruit juices. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 16, 51-54.
- ❖ BEUCHAT, L. R. (1981b). Effects of potassium sorbate and sodium benzoate on inactivating yeasts heated in broths containing sodium chloride and sucrose. *J. Food Prot.* 44, 765-769.
- ❖ BEUCHAT, L. R. (1982a.). Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *J. Food Sci.* 47, 1679-1682.
- ❖ BEUCHAT, L. R. (1987). Thermal tolerance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. *Abstr. Annu. Meeting American Society for Microbiology.* N° P-33. 280.
- ❖ Beaman, T. C. & Gerhardt, P. (1986). Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Appl Environ Microbiol* 52, 1242±1246.
- ❖ Bidan, et al., (1986). Les vins mousseux. *Bull. de l'OIV* 59, 663–664 563–626.
- ❖ Bigelow, W.D., (1921): The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infectious Diseases*, 27, 528-536.
- ❖ BIGELOW, et al., (1920) “The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms”. *J. Infectious Diseases*, 27, 602-617.



- ❖ Brown, A.D., Melling, J., (1971). “Inhibition and destruction of microorganisms by heat”. In: Hugo, W.B. (Ed.), *Inhibition and Destruction of Microbial Cells*. Academic Press, London, pp. 1 – 37.
- ❖ Cebrián, G. (2009) Tesis doctoral: Mecanismos de inactivación y resistencia de *Staphylococcus aureus* a diferentes procesos de conservación de los alimentos. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.
- ❖ Cody, et al., (1999). “An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice”. *Annals of Internal Medicine* 130, 202–209.
- ❖ CORRY, J.E.L. (1976). “In Intermediate moisture foods” (Ed.).R. Davies y KJ. Parker, Applied Science Publishers Ltd. London.
- ❖ Condón, S., López, P., Oria, R. and Sala, F.J. (1989) “Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer”. *Journal of Food Science* 54, 451–457.
- ❖ Condón, S., Palop A., Raso J., Sala F.J. (1996). “Influence of incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*”. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 149-152.
- ❖ Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. (2009). Non-isothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 506-513.
- ❖ Dutta et al. (2006). “Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree”. *Journal of Food Engineering*, 76: 538-546.
- ❖ Donahue D. W., Canitez N., Bushway A. A. (2004). “UV inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple cider”: quality, sensory and shelf-life analysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, 28 (5), 368-387. Deveze y riverau gayon 1977.
- ❖ Food and Drug Administration (2001). “Hazard Analysis and critical control points (HACCP); procedures for safe and sanitary processing and importing of juice.” U.S. Food and Drug Administration. Final Rule. *Federal Register*, 66,6138-62.
- ❖ Gould, G (1989). “Heat induced injury and inactivation. En mechanism of action of food preservation procedures”, (pag. 401-427). En Elsevier applied science (Londres).
- ❖ Gibson, B., (1973). “The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms”. *J. Appl. Bact.*, 36,365-376.

- ❖ Jermini, et al., (1987) “Heat resistance of vegetative cells and asci of two *Zygosaccharomyces* yeasts in broths at different water activity values” *J. Food Prot.*, 50 (1987), pp. 835–841.
- ❖ Komthong, P., Hayakawa, S., Katoh, T., Igura, N., & Shimoda, M. (2007). “Determination of potent odorants in apple by headspace gas dilution analysis”. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*.
- ❖ Komthong, et al., (2007 b). “Changes in the odours of apple juice during enzymatic browning”. *Food Quality and Preference*.
- ❖ Klopotek, K. Otto, V. Bohm (2005) “Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant” capacity *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, pp. 5640–5646.
- ❖ Lemcke, R. M., and H. R. White. (1959). “The heat resistance of *Escherichia coli* cells from cultures of different ages”. *J. Appl. Bacteriol.* 22:193-201.
- ❖ López P., J.L. de la fuente, and J. Burgos, (1994b). “Temperature dependence of lipoxygenase heat inactivation – evaluation whit linearly increasing temperature” profiles. *Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und – Forschung*, 199:281-284.
- ❖ B. Masschalck, R. Van HouDT , C.W. Michiels (2001), “High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin” *International Journal of Food Microbiology*, 64 pp. 325–332.
- ❖ Mackey, B.M. (2000). “Injured bacteria. En the microbiological safety and quality of food”. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker y G.W. Gould. Ed. Gaithersburg, Maryland. Aspen Publisher, Inc. Vol. I. pp. 315-341.
- ❖ Mackey B.M. y Derrick, C.M. (1982). “The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma- radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*”. *J. Appl. Bacteriol.*, 53, 243-251.
- ❖ Mounir Hassani Zerrouk. (2006) Modelización de la inactivación microbiana mediante tratamientos no-isotérmicos: aplicación a la pasteurización de los alimentos. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.
- ❖ Pagan, et al., (1998), “Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperatures” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 pp. 1038–1042.
- ❖ Roberts y hooper W., Greenwood M.(1996). “Microbiología practica de los alimentos. Editorial Acriba.

- ❖ Raso J., Barbosa-Cánovas G. V. (2002). “Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques”. *Critical reviews in food Science and Nutrition*, 43, 265-28.5
- ❖ Shibasaki, I., and T. Tsuchido. (1973). “Enhancing effect of chemicals on the thermal injury of microorganisms”. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.* 2:327-349.
- ❖ REICHART et al., (1983). “Experimental method for the determination of the thermal death parameters of microorganisms in a continuous system. *Acta alimentaria* 12(1):35.
- ❖ Ricke, S. C., Van Loo, E. J., Johnson, M. G., O'Bryan, C. A., Wrolstad, R. E., Sandeep, K. P., & Yuan, J. T. *Nonthermal Processing Technologies for Food*.
- ❖ Splittstoesser, et al., (1996), “Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice” *J. Food Prot.*, 3 pp. 226–229.
- ❖ Stumbo, (1973) C.R. Stumbo “*Thermobacteriology in Food Processing*” Academic Press Inc, New York (1973), pp. 98–102.
- ❖ Splittstoesser, D. F., (1975) *Fungi of importance in processed fruits*, En *Handbook of applied mycology* New york. pp. 201-219.
- ❖ Tomlin, R. I., and Z. J. Ordal. (1976). “Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria”, p. 153-190. In F. A.
- ❖ Skinner and W. B. Hugo (ed.), “*Inhibition and inactivation of vegetative microbes*”. Academic Press, Inc., NewYork.
- ❖ Todd et al., (1993) “Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis” *J. Food Prot.*, 52 , pp. 586–594.
- ❖ Vojdani, et al., (2008), “Juice-associated outbreaks of human illness in the United States”, through 2005 *J. Food Prot.*, 71 pp. 356–364.
- ❖ Withell E.R. (1942), “The significance of the variation in shape of time–survivor curves” *J. Hygiene*, 42 pp. 124–183.
- ❖ White, H.R., (1951). “Variation with age in the resistance of bacterial cells”. *Nature*, Lond. 168, 828.
- ❖ White, H.R., (1953). “The heat resistance of *Streptococcus faecalis*”. *J. Gen. Microbiol.* 8, 27-37.
- ❖ V curso de verano interdisciplinar “*Ciencia y Tecnología de los alimentos*. Centro de estudios comerciales del bajo Aragón- Caspe. Fundación Fernando el Católico, Zaragoza.