

**EVALUACIÓN DE CUATRO ANTIMICROBIANOS PARA EL CONTROL DE  
LEVADURAS CONTAMINANTES DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
ÁCIDO CITRICO**

**TANIA CATALINA ADARME VEGA  
MONICA PATRICIA RINCONES LIZARAZO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar por el título de  
MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C.**

**Julio de 2008**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

**EVALUACIÓN DE CUATRO ANTIMICROBIANOS PARA EL CONTROL DE  
LEVADURAS CONTAMINANTES DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
ÁCIDO CITRICO**

**TANIA CATALINA ADARME VEGA  
MONICA PATRICIA RINCONES LIZARAZO**

**APROBADO**

---

**Lizeth Amparo León Arbeláez.**  
**Microbióloga Industrial**  
**Directora**

---

**Ivonne del Socorro Gutiérrez.**  
**Bacterióloga**  
**Asesora**

---

**Andrea Carolina Aguirre**  
**Jurado**

---

**Balkys Esmeralda Quevedo.**  
**Jurado**

**EVALUACIÓN DE CUATRO ANTIMICROBIANOS PARA EL CONTROL DE  
LEVADURAS CONTAMINANTES DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DE  
ÁCIDO CITRICO**

**TANIA CATALINA ADARME VEGA  
MONICA PATRICIA RINCONES LIZARAZO**

**APROBADO**

---

**Ingrid Schuler**  
**Decana Académica**

---

**Janeth del Carmen Arias**  
**Directora de Carrera**

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a:

- La empresa SUCROMILES S.A. por permitirnos para llevar a cabo el desarrollo de nuestra investigación, además por consentir el uso del laboratorio de microbiología.
- A Lizeth León Arbelaez, y brindarnos el apoyo, orientación y guía durante el desarrollo del trabajo.
- A nuestros padres por su incondicional y permanente ayuda.
- Y a todas aquellas personas que de una forma u otra nos colaboraron en el desarrollo de la investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>16</b>
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>17</b>
2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS.....	17
2.2 CONCEPTOS IMPORTANTES.....	18
2.2.1 Ácido cítrico. ....	18
2.2.2 Obtención de ácido cítrico a partir de <i>Aspergillus niger</i> .....	19
2.2.3 Producción ácido cítrico a nivel industrial.....	19
2.2.3.1 Fermentación.....	20
2.2.3.2 Purificación.....	21
2.2.3.3 Recuperación.....	21
2.2.4 Levaduras.....	22
2.2.4.1 Morfología general.....	23
2.2.4.2 Reproducción.....	23
2.2.4.2.1 Reproducción asexual.....	23

2.2.4.2.1.1	Por brotación o gemación.....	23
2.2.4.2.1.2	Por bipartición o esquizogonia.....	23
2.2.4.2.2	Reproducción sexual.....	24
2.2.4.3	Metabolismo de las levaduras.....	24
2.2.4.4	Efectos en la industria.....	27
2.2.5	Antimicrobianos.....	27
2.2.5.1	Clases de antimicrobianos.....	28
2.2.5.1.1	Antimicrobianos naturales.....	28
2.2.5.1.2	Antimicrobianos químicos.....	29
2.2.5.1.2.1	Ácido sórbico y sorbato de potasio.....	30
2.2.5.1.2.2	Ácido benzoico y benzoato de sodio.....	30
2.2.5.1.2.3	Metabisulfito de sodio.....	31
2.2.5.2	Tipo de acción de los antimicrobianos.....	31
2.2.5.2.1	Acción de los antimicrobianos sobre los microorganismos.....	32
2.2.6	Actividad antimicrobiana.....	32
2.3	Uso de antimicrobianos en industrias alimenticias.....	34
<b>3.</b>	<b>FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION</b>	<b>35</b>
3.1	Formulación del problema.....	35
3.2	Justificación.....	35

<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	Objetivo General.....	36
4.2	Objetivos específicos.....	36
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
5.1	Ubicación y diseño de la investigación.....	37
5.2	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
5.2.1	Toma de muestra.....	38
5.2.2	Obtención y aislamiento de cepas.....	38
5.2.3	Selección del medio de cultivo.....	38
5.2.4	Conservación de cepas.....	39
5.2.5	Identificación de levaduras.....	39
5.2.6	Preparación del inóculo.....	39
5.2.7	Pruebas de CMI (concentración mínima inhibitoria).....	40
5.2.7.1	Difusión en placa.....	41
5.2.7.2	Dilución en tubo.....	42
5.2.8	Ensayo en columna de burbujeo.....	42
5.3	Recolección de la información.....	43
5.4	Análisis de la información.....	44
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>

6.1	Obtención y aislamiento de cepas.....	45
6.1.1	Cepa obtenida a partir del tanque de fermentación.....	45
6.1.2	Cepa obtenida a partir del tanque de sustrato.....	46
6.1.3	Recuperación de cepa control, <i>S. cerevisiae</i> (muestra comercial)...	46
6.2	Selección del medio de cultivo.....	48
6.3	Identificación de levaduras.....	54
6.4	Determinación del inóculo.....	50
6.5	Pruebas de CMI (Concentración mínima inhibitoria).....	51
6.5.1	Difusión en agar.....	51
6.5.2	Dilución en tubo.....	54
6.6	Ensayo en columnas de burbujeo.....	57
6.7	Análisis estadístico.....	62
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## INDICE DE TABLAS.

<b>TABLA 1</b>	Ensayos de CMI para la prueba de difusión en placa.....	40
<b>TABLA 2</b>	Ensayo de dilución en tubo.....	41
<b>TABLA 3</b>	Ensayos a escala piloto.....	43
<b>TABLA 4</b>	Descripción de levadura aislada de tanque de fermentación.....	45
<b>TABLA 5</b>	Descripción de levadura aislada de tanque de sustrato.....	46
<b>TABLA 6</b>	Descripción de levadura control ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	47
<b>TABLA 7</b>	Características macro y microscópicas de las tres cepas.....	48
<b>TABLA 8</b>	Determinación de CMI por método de difusión en placa.....	52
<b>TABLA 9</b>	Determinación de CMI Y CMM por el método de dilución en tubo...	54

## INDICE DE FIGURAS.

<b>FIGURA 1</b>	Reactor, columna de burbujas.....	21
<b>FIGURA 1</b>	Ciclo de vida de la Levadura.....	23
<b>FIGURA 2</b>	Ciclo de ácido cítrico.....	26
<b>FIGURA 3</b>	Grafico curvas de crecimiento de levaduras.....	50
<b>FIGURA 4</b>	Ensayo 1 en columna. Grafica <i>C. glabrata</i> .....	58
<b>FIGURA 5</b>	Ensayo 1 en columna. Grafica <i>S. cerevisiae</i> .....	58
<b>FIGURA 6</b>	Ensayo 1 en columna. <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> Vs. Antimicrobianos a diferentes concentraciones. Hora 12 de exposición.....	60
<b>FIGURA 7</b>	Ensayo 2 en columna. Grafica <i>C. glabrata</i> .....	61
<b>FIGURA 8</b>	Ensayo 2 en columna. Grafica <i>S.cerevisiae</i> .....	61
<b>FIGURA 9</b>	Ensayo 2 en columna. <i>C. glabrata</i> y <i>S. cerevisiae</i> Vs. Antimicrobianos a diferentes concentraciones. Hora 12 de exposición.....	63

## INDICE DE FOTOGRAFIAS

<b>FOTOGRAFIA 1</b>	Aislamiento en agar YM de la levadura de fermentación.....	45
<b>FOTOGRAFIA 2</b>	Aislamiento en agar YM de la levadura de sustrato.....	46
<b>FOTOGRAFIA 3</b>	Aislamiento en agar YM de la levadura control.....	47
<b>FOTOGRAFIA 4</b>	Técnica dilución en tubo Ensayo 2. <i>C. glabrata</i> .....	56
<b>FOTOGRAFIA 5</b>	Colonias características de <i>C. glabrata</i> en agar PDA.....	98
<b>FOTOGRAFIA 6</b>	Colonias características de <i>C. glabrata</i> en agar YM.....	98
<b>FOTOGRAFIA 7</b>	Colonias características de <i>C. glabrata</i> en agar SB.....	98
<b>FOTOGRAFIA 8</b>	Colonias características de <i>S. cerevisiae</i> en agar PDA.....	98
<b>FOTOGRAFIA 9</b>	Colonias características de <i>S. cerevisiae</i> en agar YM.....	98
<b>FOTOGRAFIA 10</b>	Colonias características de <i>S. cerevisiae</i> en agar SB.....	98
<b>FOTOGRAFIA 11</b>	Colonias características de <i>S. cerevisiae</i> (control) en agar PDA	99
<b>FOTOGRAFIA 12</b>	Colonias características de <i>S. cerevisiae</i> (control) en agar YM	99
<b>FOTOGRAFIA 13</b>	Colonias características de <i>S. cerevisiae</i> (control) en agar SB	99

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	Ficha técnica de levadura seca activa Thermosacc dry.....	70
<b>ANEXO B</b>	Composición de medios de cultivo.....	71
<b>ANEXO C</b>	Resultados de identificación de las dos levaduras contaminantes aisladas del proceso de producción de ácido cítrico.....	73
<b>ANEXO D</b>	Curvas de crecimiento de levaduras.....	74
<b>ANEXO E</b>	Ficha técnica de antimicrobianos evaluados.....	76
<b>ANEXO F</b>	Resultados obtenidos en los ensayos en columnas de burbujeo. Levadura de fermentación.....	94
<b>ANEXO G</b>	Resultados obtenidos en los ensayos en columnas de burbujeo. Levadura Sustrato.....	96
<b>ANEXO H</b>	Aspecto macroscópico de las tres levaduras evaluadas.....	98
<b>ANEXO I</b>	Estadística de ensayos en columna de burbujeo.....	100

## RESUMEN

Con el fin de sustituir el uso del metabisulfito de sodio en el proceso de fermentación de ácido cítrico para controlar el crecimiento de levaduras contaminantes en una empresa productora de ácido cítrico del Valle del Cauca. Se realizó el aislamiento y la identificación de las dos cepas contaminantes del proceso mediante el método de Microscan. Se evaluaron antimicrobianos (benzoato de sodio, sorbato de potasio, ácido benzoico y ácido sórbico) a nivel de laboratorio mediante el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando la técnicas de difusión en agar y dilución en tubo. Con las CMI seleccionada se evaluó cada antimicrobiano a escala piloto simulando las condiciones del proceso y se determinó el antimicrobiano y la concentración adecuada para el control de levaduras en dicho proceso. Las levaduras aisladas fueron *Cándida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*. La técnica de difusión en agar no presentó datos consistentes mientras que al emplear la técnica dilución en tubo se observó un crecimiento inferior a 10 UFC/ml a una concentración de 200ppm para el benzoato de sodio y de 300ppm para el restante de antimicrobianos evaluados incluyendo el metabisulfito de sodio, que actuó como control positivo durante el estudio. Los resultados a escala piloto mostraron un efecto inhibitorio total a 500ppm luego de 24 horas de exposición, para el ácido sórbico y el ácido benzoico, en tanto que las sales disminuyeron su efecto inhibitorio. Finalmente se seleccionó el ácido sórbico basado en los criterios de inhibición microbiana, toxicidad y efecto sobre el producto.

### **Palabras claves:**

Ácido benzoico, Ácido sórbico, Antimicrobiano, Benzoato de sodio, Sorbato de potasio. *Cándida glabrata*, Concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima microbicida (CMM), Metabisulfito de sodio, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

With the objective of substituting the use of sodium metabisulfite on the fermentation process of citric acid obtained to control the growth of non-desirable yeasts in a company producing citric acid of Valle del Cauca. An isolation and a identification of the two present non-desirable yeasts was made from the processes using the Microscan method. Antimicrobials were evaluated (sodium benzoate, potassium benzoate, benzoic acid and sorbic acid) under laboratory levels using the method of minimum inhibitorian concentration (CMI) taking into account the techniques of plaque diffusion and tube dilution. With the selected CMI each antimicrobial was evaluated to scale pilot simulating the conditions of the process and it the antimicrobial and the appropriate concentration were determined for the control of yeasts in this process. The isolated yeasts were *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. The plaque diffusion technique did not present consistent data while on the tube dilution technique an inferior growth of 10 UFC/ml on 200 ppm for sodium benzoate and 300 ppm for the rest of antimicrobians used including sodium metabisulfite were detected, the last one was also used as a positive control during this study. The results to pilot-level essays showed a total inhibitory effect at 500ppm after 24 hours of exhibition for the sorbic acid and benzoic acid, as long as the salts diminished their inhibitory effect. Finally, sorbic acid was selected over benzoic acid based on the approaches of microbial inhibition, toxicity and effect on the product.

**Key words:** Benzoic acid, sórbico acid, antimicrobial, Sodium benzoate, potassium sorbate, *Candida glabrata*, minimum inhibitory concentration (CMI), minimum concentration microbicide (CMM), sodium metabisulfite, *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de ácido cítrico se lleva a cabo mediante tres etapas que corresponden a obtención, purificación y recuperación del producto. En la etapa de obtención, se utiliza el hongo *Aspergillus niger*, el cual por vía fermentativa va a transformar el sustrato del medio en ácido cítrico; debido a que el sustrato utilizado es azucarado, resulta ser un proceso susceptible a la contaminación con levaduras, que compiten por espacio y nutrientes con el hongo productor, causando una disminución en la eficacia del proceso.

Para contrarrestar esta situación, se hace necesario el uso de sustancias antimicrobianas que ejerzan su control mediante la inhibición de enzimas del metabolismo o las proteínas involucradas en el mantenimiento y estabilidad de la célula; sin embargo, muchas de estas, a pesar de ser eficaces contra los microorganismos contaminantes pueden no ser aptas en la industria de alimentos y aditivos, debido al efecto tóxico que generan en el consumidor. Entre dichas sustancias se encuentra el metabisulfito de sodio, ampliamente empleado en la industria alimenticia para controlar el crecimiento de microorganismos contaminantes; sin embargo su condición alérgica crea la necesidad de encontrar un sustituto que logre el control microbiano deseado.

De igual forma resulta importante destacar que al ser la producción de ácido cítrico un proceso biotecnológico en el cual se trabaja con un microorganismo susceptible a los efectos de los antimicrobianos, no es posible su adición en el inicio del proceso ya que afectaría no solo a las levaduras contaminantes sino al hongo productor, razón por la cual su adición se realiza al final de la primera etapa del proceso, y representa un control posterior; ya que al mismo tiempo que impide la entrada de levaduras contaminantes en etapas posteriores, reduce la posibilidad de una re-contaminación del fermentador. Lo que causaría un efecto aun más perjudicial durante el proceso.

Debido a lo anterior, el presente trabajo se enfoca en la búsqueda de una sustancia con propiedades antimicrobianas similares a las del metabisulfito de sodio para controlar el crecimiento de las levaduras contaminantes de la primera etapa del proceso de producción de ácido cítrico.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS**

Con el paso de los años se ha visto la importancia de implementar diferentes estrategias que permitan eliminar o inhibir la presencia de microorganismos contaminantes de los diferentes productos alimenticios, mejorando así la calidad y seguridad de los mismos. Es por esto que desde tiempos remotos, el hombre se vio en la necesidad de utilizar algunas sustancias con propiedades antimicrobianas, basándose en su instinto, creencias y conocimientos adquiridos por la experiencia, al no disponer de estudios y medidas efectivas que ayudaran a contrarrestar dicha situación. De ahí que la aparición de los antimicrobianos constituya uno de los hitos más trascendentales no sólo de la historia de la medicina, sino también de la historia de la humanidad, al reducir las cifras de mortalidad con su introducción en la clínica a principios de la década de 1940, donde los antimicrobianos comienzan a tomar fuerza mediante descubrimientos de la penicilina por Fleming en 1929 y la estreptomicina por Waksman en 1944 entre otros. (González, J y Calvo, A. 2005)

De igual forma, el uso de antimicrobianos como conservantes también ha sido de gran importancia, ya que han permitido alargar la vida de los productos de anaquel al evitar la colonización por microorganismos alteradores; razón por la cual el uso de diversos ingredientes con características antimicrobianas como la sal, el azúcar, el vinagre y las especias han tenido gran relevancia en la industria alimenticia, al igual que diversos compuestos capaces de prevenir los procesos de descomposición, entre los que se destacan: cultivos, proteínas, derivados vegetales y los ácidos orgánicos, así como sus sales. Gracias a este tipo de compuestos se han logrado reducir notablemente las implicaciones económicas tanto para fabricantes (deterioro de materias primas y productos terminados antes de su comercialización) como para distribuidores y consumidores (deterioro del producto luego de su adquisición y antes de su consumo) (Industria Alimenticia. 2006).

En los procesos fermentativos cuyo objetivo es la obtención de alcohol por ejemplo, el tipo de sustratos empleadas favorece la aparición de microorganismos no deseables, como las levaduras salvajes, que causan efectos perjudiciales al interrumpir la producción del

producto deseado a través del uso de vías fermentativas diferentes a la empleada por el microorganismo productor. Sin embargo, pese a ser alteradores de procesos y alimentos, las levaduras también son consideradas como microorganismos favorables cuando se asocian a los alimentos, debido al papel que juegan en la obtención de productos y bebidas fermentables, entre los que se conocen la fabricación de pan, productos de pastelería, producción de alcohol, vinos, cidras, cervezas, entre otros (Orberá, M. 2004).

Uno de los efectos perjudiciales que las levaduras pueden ejercer a nivel industrial, es la aparición en el proceso de producción de ácido cítrico; este es el caso que suele presentarse en una empresa biotecnológica productora del ácido en mención. En dicha empresa, los análisis microbiológicos y de identificación previos del proceso, han permitido establecer como fuentes de contaminación: el sustrato (tanques de sustrato preparado) y el aire que ingresa a la fermentación (tanques de fermentación); que originan la presencia de dos tipos de levaduras diferentes, las cuales anteriormente fueron identificadas como *Cándida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## **2.2 CONCEPTOS IMPORTANTES**

### **2.2.1 Ácido cítrico.**

El ácido cítrico, o su forma ionizada, el citrato, es un ácido orgánico tricarboxílico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Su fórmula química es  $C_6H_8O_7$ . Es un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchos alimentos como las conservas de vegetales enlatados. En bioquímica aparece como un metabolito intermediaria en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, proceso realizado por la mayoría de los seres vivos. (Wikipedia. 2008)

En sus orígenes el ácido cítrico era obtenido a partir del jugo de limón. Fue obtenido por primera vez en 1784, por un químico Suizo llamado Carl Scheele, usando en el proceso cal-sulfúrico. Fue producido comercialmente a partir de limones italianos cerca de 1826, en Inglaterra por John y Edmund Sturge. El ácido cítrico también fue obtenido sintéticamente

a partir de glicerol por Grimoux y Adams en 1880 y luego de forma simétrica de dicloroacetona. (Kristansen, B. et al. 1999). Tiempo después se observó que algunos hongos producen ácido cítrico cuando son puestos a crecer en medio azucarado.

Desde 1920 fueron desarrollados procesos de fermentación, en donde se utiliza generalmente cepas de *Aspergillus niger*, aunque también han sido empleadas ciertas levaduras. En 1923, los hermanos Pfizer logran obtener ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger* mediante la fermentación de azúcar. Los primeros estudios que se hicieron para la producción de ácido cítrico por fermentación demostraron ser un proceso extremadamente complejo. (Quiminet. 2008)

### **2.2.2 Obtención de ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger***

El ácido cítrico es un producto metabólico primario y se forma en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La glucosa es la principal fuente de carbono utilizada para la producción de ácido cítrico. En la trofofase, parte de la glucosa añadida se utiliza para la producción de micelio y se convierte, a través de la respiración, en CO<sub>2</sub>. En la idiofase, el resto de glucosa se convierte en ácidos orgánicos existiendo una pérdida mínima por respiración. Durante la idiofase y cuando el nivel de sustrato es alto, se expresan todas las enzimas del ciclo de Krebs excepto la α-cetoglutarato deshidrogenasa. La actividad citrato sintasa aumenta por un factor de 10, mientras que las actividades de los enzimas que catabolizan el ácido cítrico, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa, se reducen drásticamente en comparación con su actividad durante la trofofase. Esto da lugar a una acumulación y excreción de ácido cítrico por el microorganismo sobrecargado (González, P. 2008).

### **2.2.3 Producción ácido cítrico a nivel industrial.**

La preparación del ácido cítrico consiste, en términos generales, en una fermentación aeróbica de la sacarosa, utilizando *Aspergillus Níger*, que lo produce como metabolito secundario; luego la posterior purificación, mediante el proceso cal-sulfúrico y la recuperación final del producto.

### 2.2.3.1 Fermentación:

Dentro de esta la etapa del proceso se encuentra la preparación del sustrato. Lo primero que se realiza es la purificación del jarabe. Se inicia mezclando el jarabe con agua para diluirlo; una vez diluido se pasa por un filtro de vacío para eliminar los sólidos suspendidos y las impurezas de la melaza. Luego el jarabe es pasado por una celda de intercambio iónico para retirar los iones del flujo. Después el jarabe es sometido a un proceso de pasteurización que consiste en elevar la temperatura a 105°C durante tres minutos y bajarla nuevamente hasta 37°C (Carvajal, F. y Rojas, C. 1993). La pasteurización se lleva a cabo primero en un calentador de evaporación instantánea, después se utiliza un circuito de acumulación y un enfriador de jarabe. (Austin, G. 1983, Carvajal, F. y Rojas, C. 1993).

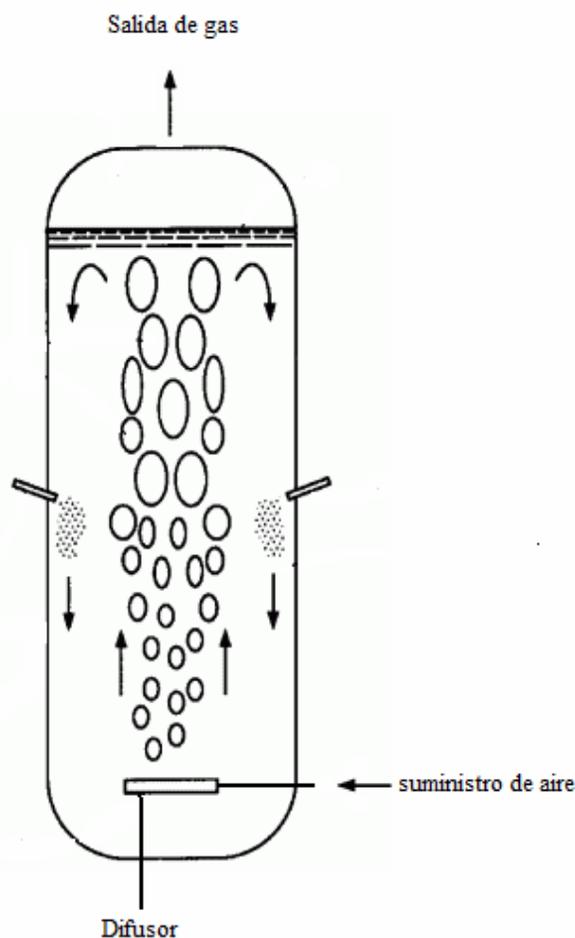


Figura 1. Reactor. Columna de burbujas (Kingsley, J. *et al.* 2001)

Una vez pasteurizado el sustrato, es bombeado al fermentador el cual es una columna de burbujeo (figura 1), en donde se lleva a cabo la transformación de la sacarosa en ácido cítrico por medio de *Aspergillus Níger*. Este es inoculado en el fermentador, por medio de la transferencia de biomasa proveniente del germinador de esporas. Una vez el microorganismo se encuentra en el fermentador se inicia la producción de ácido cítrico.

Las columnas de burbujas consisten en recipientes cilíndricos, con altura superior al doble del diámetro. Aparte del difusor para la inyección del aire comprimido, los reactores de columna de burbujas no presentan estructuras internas. Las ventajas de las columnas de burbujas incluyen los bajos costos de capital, ausencia de partes móviles, y un adecuado rendimiento de transferencia de materia y de la transmisión de calor. (Doran, P. 1998)

#### **2.2.3.2 Purificación:**

El ácido cítrico debe ser separado del micelio, el azúcar residual, las proteínas producidas por la fermentación y otras impurezas solubles. Para lo cual se lleva a cabo el proceso denominado cal-sulfúrico: se basa en tratar el licor madre con una lechada de la cal ( $\text{Ca(OH)}_2$  cal apagada) de lo cual se forma citrato de calcio. Este citrato resultante es lavado y el micelio es filtrado. Posteriormente se añade ácido sulfúrico para descomponer el citrato de calcio. Por lo tanto en esta etapa se forma sulfato de calcio el cual es retirado de la solución por medio de un filtro rotatorio al vacío y se constituye como un desperdicio o como un subproducto del proceso (Carvajal, F. y Rojas, C. 1993). Finalmente pasa por celdas de carbon activado.

#### **2.2.3.3 Recuperación del ácido cítrico:**

Una vez purificado el ácido cítrico, este prosigue a un proceso de cristalización y secado. En el tanque de la cristalización la mayoría del agua es evaporada, entonces la solución es enfriada y el ácido cítrico se cristaliza. El agua evaporada se condensa y los cristales de ácido cítrico son separados y lavados en el filtro rotatorio de vacío; el licor madre es reciclado al tanque de cristalización para aumentar el rendimiento de la recuperación. Una parte del licor madre se purga para evitar la acumulación de sustancias

indeseables como glucosa, ácido grasos, sodio, cloruros, el ácido cítrico tiene que ser evaporado para obtener un rendimiento alto de la concentración deseada para el producto (Heinzte, E. *et al.*2007).

En el secado se recupera ácido cítrico monohidratado, que ha sido pasado por el secador, usando aire precalentado (Heinzte, E. *et al.*2007). Finalmente el producto obtenido es empacado. (Carvajal, F. y Rojas, C. 1993).

#### **2.2.4 Levaduras**

Las levaduras pueden ser definidas como organismos unicelulares que hacen parte de los hongos; a pesar de ser reconocidas como unitarios algunas veces pueden ser encontradas en forma de cadena e incluso formando diverso tipo de filamentos (Halasz, y Lasztity, 2000).

Las levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales herbívoros y omnívoros. Algunas están asociadas con insectos pero el suelo es el mayor reservorio. La gran mayoría de las levaduras son mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento entre 24 y 48°C, solo unas pocas (2%) son psicrófilas con una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 24°C, pero mayor es el número de las levaduras que tienen la temperatura óptima de crecimiento por debajo de 20°C. No hay reporte de levaduras que puedan crecer a 50°C y solamente unas pocas pueden desarrollar cerca de 0°C (Carrillo, L. 2003).

Las levaduras poseen numerosas aplicaciones en la biotecnología tradicional y moderna. Participan en procesos de producción de alimentos, proteínas de organismos unicelulares y en las últimas décadas se han incorporado a la industria biotecnológica como agentes para la producción de proteínas de eucariontes. A pesar de las ventajas que poseen, algunos géneros son causantes de micosis en el hombre y, en otros casos, son patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos por trasplantes o infecciones virales. Pueden ser también causantes del deterioro de alimentos frescos y elaborados para el consumo humano, como el vino (Rivero, A. *et al* 2004).

#### **2.2.4.1 Morfología general**

Cuando crecen en medios sólidos, las colonias jóvenes de estos microorganismos tienen casi siempre un aspecto muy característico, siendo húmedas y algo viscosas. En general son blanquecinas, de color crema o rosadas, pero hay especies de color diferente. Las colonias de algunas especies cambian poco con la edad, pero otras se vuelven gradualmente de aspecto seco y rugoso. Casi todas las especies crecen en forma de agregados sueltos de células aisladas que pueden ser globosas, ovoides, más o menos piriformes, o alargadas y casi cilíndricas (Moore, E. 1996).

#### **2.2.4.2 Reproducción**

Su reproducción puede ser de tipo sexual, asexual o incluso pueden presentar los dos tipos, sin embargo, la reproducción asexual por fisión binaria o gemación es el tipo más común y consiste en la división de la célula dando origen a una invaginación que evoluciona hasta obtenerse dos células idénticas con el mismo material genético, proceso denominado mitosis (Jacques et al, 1999).

**2.2.4.2.1 Reproducción asexual:** Tiene lugar cuando el medio es rico en sustancias nutritivas, y se realiza de distintas formas:

**2.2.4.2.1.1 Por brotación o gemación:** La célula madre forma una yema al mismo tiempo que divide su núcleo por estrangulación, la yema aumenta de tamaño y se provee de los elementos constituyentes de la célula madre, posteriormente, la yema se rompe y se separa de la madre; ya separada, la célula hija o blastosporo crece hasta transformarse en una célula adulta, la cual será luego una nueva célula madre, y así sucesivamente mientras el medio sea favorable (Bartra, E. 2000).

**2.2.4.2.1.2 Por bipartición o esquizogonia:** cuando una célula está en condiciones de reproducirse, comienza a dividir su núcleo en dos núcleos hijos, cada uno de los cuales se rodea de una porción de protoplasma, luego aparece un tabique por el ecuador de la célula

separándola en dos células hijas, las que continúan reproduciéndose en la misma forma mientras el medio sea adecuado (Guthrie, C. 1991).

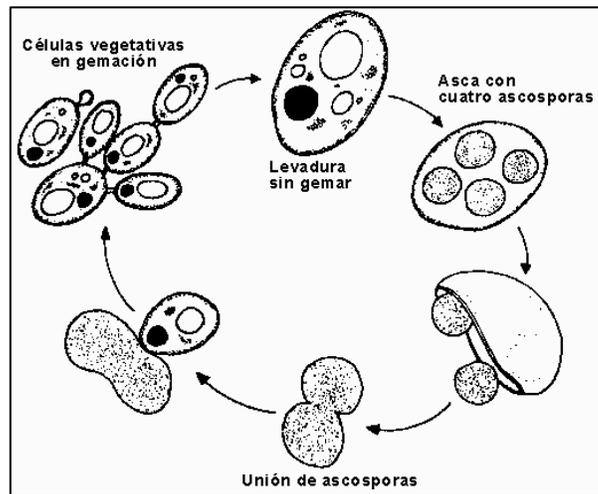


Figura. 2 Ciclo de vida de la Levadura (García, R. 2007)

**2.2.4.2.2 Reproducción sexual:** Tiene lugar cuando el medio es deficiente en materias nutritivas, el microorganismo se defiende formando células especiales muy resistentes. Esta clase de reproducción origina ascosporos, los cuales son esporos sexuales internos encerrados en formaciones especiales llamadas ascos. Al encontrarse dos células de distintas polaridad, cada una de ellas emite un filamento reproductivo, los que se aproximan hasta ponerse en contacto mientras que simultáneamente los núcleos de cada célula migran al filamento respectivo, las membranas se gelifican en la zona de contacto y se entremezclan al mismo tiempo los núcleos (cariogamia) y los protoplasmas (plasmogamia), luego se produce la reducción cromática por meiosis, cada núcleo resultante se dirige a su célula correspondiente y allí cada núcleo se divide por mitosis originando dos núcleos más (González y Valenzuela. 2001).

### 2.2.4.3 Metabolismo de las levaduras

Las levaduras son organismos aerobios y aunque unas especies son fermentadoras otras no lo son. Algunas poseen un metabolismo facultativo, el cual depende de la disponibilidad de oxígeno presente en el medio en el que se encuentran.

La propagación de las levaduras es un proceso mediante el cual se convierte el oxígeno y el azúcar en biomasa y energía a través del ciclo de krebs y la ruta de la glucólisis, este proceso es conocido como metabolismo oxidativo. De la misma manera cuando hay ausencia de oxígeno, algunas levaduras con capacidad de vivir bajo estas condiciones, realizan glucólisis en anaerobiosis y el piruvato generado tras este proceso se convierte en etanol por acción enzimática (Mathews *et al*, 2002).

La glucólisis, ruta por la cual se metabolizan las hexosas, puede realizarse en condiciones anaerobias, sin la oxidación neta de los azúcares sustrato así como también en condiciones aerobias. La ruta se selecciona dependiendo de las condiciones y necesidades del microorganismo (Mathews *et al*, 2002).

Además de la glucólisis, dentro de las reacciones aerobias para la degradación de los azúcares se encuentra el ciclo del ácido cítrico ó ciclo de Krebs, el cual se constituye en la ruta oxidativa central de la respiración, pues a través de esta, se catabolizan todos los combustibles metabólicos (carbohidratos, lípidos y proteínas) en los organismos y tejidos aerobios (Mathews *et al*, 2002).

Aunque la glucólisis y la respiración conservan la energía liberada en forma de ATP, en la glucólisis se genera una energía total mucho menor, es decir que por cada mol de 26 sustrato catabolizado, la glucólisis produce menos energía total que la respiración completa (Mathews *et al*, 2002).

La reacción global de glucólisis es la siguiente:



Esta importante vía metabólica para la degradación de hexosas es realizada por la levadura tanto en la etapa de reproducción como en la etapa de fermentación para la producción de etanol a partir de sustratos azucarados. En condiciones de aireación (presencia de oxígeno en el medio), después de la generación del piruvato a través de glucólisis al interior de la

mitocondria de la levadura, el microorganismo inicia su proceso de respiración, la cual se realiza en tres etapas:

- 1) El piruvato, por acción del complejo piruvato deshidrogenada, es oxidado a Acetil-coA.
- 2) en el ciclo del ácido cítrico, la oxidación del carbono produce CO<sub>2</sub>, transportadores electrónicos reducidos y una pequeña cantidad de ATP.
- 3) los transportadores electrónicos reducidos se reoxidan, aportando energía para la síntesis de mas ATP (Mathews et al, 2002).

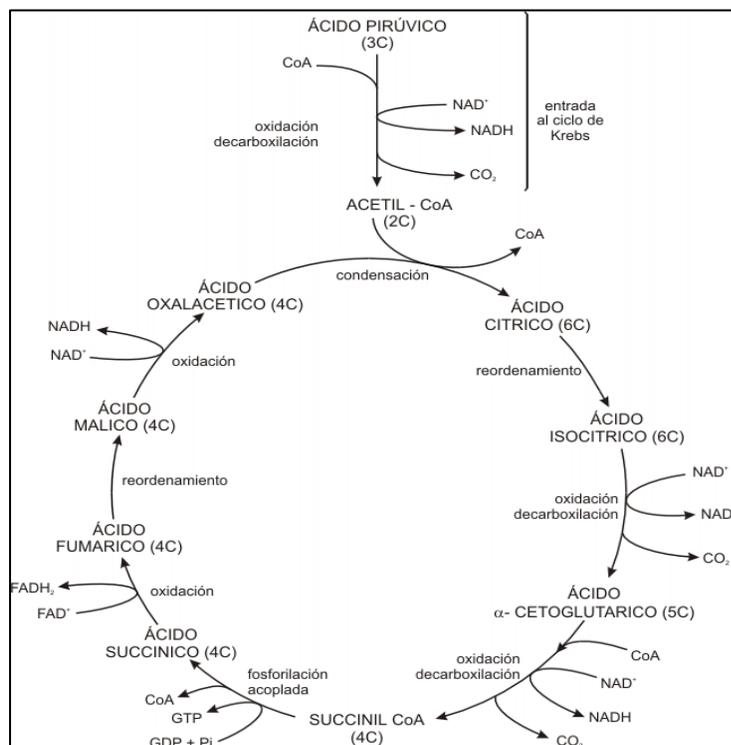


Figura 3. Ciclo de ácido cítrico. (Márquez & Zabala 2008)

Por otro lado, en condiciones anaerobias, es decir condiciones de fermentación, el metabolismo del piruvato sigue otra vía que se denomina vía fermentativa, donde el piruvato tiene numerosos destinos alternativos en los microorganismos anaerobios y microaerófilicos, en el caso de las bacterias lácticas, reducen el piruvato a lactato en un solo paso, mientras las levaduras convierten el piruvato en etanol en una ruta de dos pasos.

Es así como el metabolismo del piruvato producido por glucólisis a partir de las hexosas, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y de los microorganismos presentes en el medio (Calderón, M. 2007.)

#### **2.2.4.4 Efectos en la industria**

La contaminación microbiana de alimentos es un problema serio para la industria alimentaria, ya que da lugar a la aparición de productos inaceptables para el consumo humano, ocasionando de esta manera grandes pérdidas económicas. Aunque el papel de las levaduras es secundario en la contaminación microbiana de alimentos, las condiciones ambientales de preservación de estos, que tienden a inhibir el crecimiento de bacterias, han favorecido la aparición de levaduras contaminantes, causantes igualmente de afectaciones en los parámetros organolépticos de buena calidad (Orberá, T. 2004).

Existen determinadas técnicas para la preservación de alimentos que inhiben el crecimiento de las bacterias, pero al mismo tiempo favorecen el crecimiento de las levaduras, lo cual está dado por el hecho de que estos grupos son mucho más resistentes a condiciones ambientales estresantes; entre las que predominan baja actividad de agua, bajos valores de pH por el uso de ácidos orgánicos como preservantes químicos, bajos valores de temperatura y el uso de antimicrobianos y otros inhibidores ya sean naturales o sintéticos.

La actividad contaminante de las levaduras sobre alimentos puede inhibirse por dos vías; mediante la aplicación de métodos físicos con actividad bactericida, entre los que se destacan la esterilización por calor a presión, la filtración, la adición de sustancias antimicrobianas contra las levaduras, y por la aplicación de condiciones ambientales desfavorables con efecto bacteriostático, tales como disminución de la  $a_w$ , bajos valores de pH y temperatura (Orberá, M. 2004).

#### **2.2.5 Antimicrobianos**

Los antimicrobianos son sustancias de carácter sintético o natural, capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos (Microbiología. 2007). Muchos de estos agentes

han sido exitosamente incorporados directamente en materiales de empaque que confieren propiedades antimicrobianas, dentro de ellos se encuentran los sulfitos y dióxido de azufre, nitrito, sales de nitrato, ácido sórbico y sus sales de sodio y potasio, ésteres de glicerol, ácido propiónico, epóxidos, antibióticos y algunos aceites naturales esenciales entre otros (Castell-Perez, M.E. *et al* 2007). Los preservativos más comúnmente encontrados en alimentos son de tipo ácido como el sórbico, benzoico, propiónico, ácido acético, además de sulfitos. (Martorell, P. *et al.* 2006).

En principio, la protección o conservación antimicrobiana, requiere siempre que los productos orgánicos que contengan agua se almacenen a temperatura normal o elevada. Esto es porque los microorganismos requieren para crecer, en particular, calor, humedad y nutrientes (Merck, 2007).

#### **2.2.5.1 Clases de antimicrobianos**

Actualmente los antimicrobianos o conservantes se clasifican en tradicionales y naturales. Donde se consideran los conservadores tradicionales como aquellas sustancias químicas incluidas dentro de la normativa vigente y los conservadores naturales como sustancias que se obtienen o se derivan de materiales o procesos biológicos y cuya inocuidad se atribuye a que cuando se ingieren son degradados por el organismo (García, M. 2004).

##### **2.2.5.1.1 Antimicrobianos naturales**

Son compuestos naturales capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos. Un amplio rango de sistemas antimicrobianos naturales ha sido desarrollado a partir de microorganismos, plantas y animales, muchos de ellos empleados para la conservación de alimentos. Entre estos se encuentran:

1. Antimicrobianos derivados de los animales, como las enzimas y proteínas.
2. Antimicrobianos derivados de microorganismos, entre los que se encuentran los antibióticos.

3. Antimicrobianos derivados de plantas, los cuales, según la asociación Americana de Comercio de las Especies se definen como cualquier producto de plantas seco y utilizado como condimento (García, M. 2004).

#### **2.2.5.1.2 Antimicrobianos químicos**

La FDA define un conservante químico como cualquier compuesto de carácter sintético que cuando se adiciona a un alimento tiende a prevenir o retardar su deterioro, pero no se incluye sal común, azúcares, vinagres, especias y sustancias que se adicionan al alimento por exposición directa como humo de madera o químicos implicados por sus propiedades insecticidas o herbicidas (García, M. 2004).

De igual forma, Davidson (1996) define a los antimicrobianos químicos o sintéticos como compuestos químicos añadidos o presentes en alimentos. Esto incluye a varios ácidos orgánicos, parabenos, sulfitos y sorbatos.

Los compuestos químicos son capaces de actuar como conservadores de alimentos, pero en los productos solo está permitido su uso en concentraciones relativamente pequeñas.

Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos como GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros):

1. Ácido propiónico y propionatos (para mohos)
2. Ácido sórbico y sorbatos (para mohos)
3. Ácido benzoico y benzoatos (para mohos y levaduras)
4. Parabenos (para mohos, levaduras y bacterias)
5. Diacetato de sodio (para mohos)
6. Etil-formato (para mohos y levaduras)
7. Nicina (para bacterias ácido lácticas y Clostridia)
8. Nitrito de sodio (Clostridia) (García, M. 2004)

De los antimicrobianos mencionados anteriormente los más empleados en la conservación de alimentos son:

#### **2.2.5.1.2.1 Ácido sórbico y sorbato de potasio**

El ácido sórbico es un ácido graso insaturado, presente de forma natural en algunos vegetales, pero fabricado para su uso como aditivo alimentario por síntesis química. Son especialmente eficaces contra mohos y levaduras, y menos contra las bacterias (Milk science, 2007).

El ácido sórbico se utiliza tanto como ácido libre como en diversas formas (polvo, gránulos, soluciones) de sus sales potásica y cálcica. El sorbato de potasio se presenta como polvo blanco y en gránulos siendo el más soluble de los sorbatos. (Lück y Jager. 2000).

Los sorbato inhiben la captación de aminoácidos y el brote de células vegetativas a partir de esporas. Enzimas como malato, isocitrato,  $\alpha$ -cetoglutarato y succinato deshidrogenasas, fumarasa y aspartasa se inhiben con sorbato (Barbosa, *et al.* 1999). Además el ácido sórbico forma enlaces covalentes con los grupos SH de las enzimas mediante sus propios dobles enlaces, siendo inactivados de esta manera. El efecto inhibitor del ácido sórbico es improbable que sea debido a la inhibición de una única enzima. Los puntos de ataque en las células pueden diferir en bacterias, levaduras y mohos (Lück y Jager. 2000).

Para que el ácido sórbico sea capaz de ejercer su acción dentro de la célula de los microorganismos, tiene que penetrar primero a través de la pared celular. Cuando esto sucede, es principalmente el componente ácido no disociado el que entra en la célula (Lück y Jager. 2000)

#### **2.2.5.1.2.2. Ácido benzoico y benzoato de sodio.**

El ácido benzoico se utiliza en su forma como tal y en forma de benzoato sódico, que tiene mayor solubilidad en agua. Este es uno de los agentes químicos que se utiliza desde hace más tiempo en las industrias de alimentos, fármacos y cosméticos. La sal sodio del ácido benzoico fue el primer conservante químico aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos. El ácido benzoico se encuentra de modo natural en arándanos, ciruelas, canela, manzanas, fresas y yogurt (Barbosa, *et al.* 1999)

La acción antimicrobiana del ácido benzoico se basa en diversas intervenciones sobre el sistema enzimático de la célula de los microorganismos. En muchas bacterias y levaduras resultan inhibidas enzimas que controlan el metabolismo del ácido acético y la fosforilación oxidativa. El ácido benzoico parece intervenir en varios sitios del ciclo del ácido cítrico, especialmente en el ácido  $\beta$ -cetoglutárico y el ácido succínico deshidrogenasa; el ácido benzoico parece que tiene acción sobre la tirosinasa. Además de sus efectos inactivadores de enzimas, el ácido benzoico actúa también sobre la pared celular. Para que pueda ejercer su efecto dentro de la célula, el ácido tiene que penetrar a través de la pared celular. Cuando esto ocurre, la parte no disociada es la que tiene la mayor acción antimicrobiana y penetra con mayor facilidad en la célula (Lück y Jager. 2000).

#### **2.2.5.1.2.3. Metabisulfito de sodio**

El metabisulfito o anhídrido sulfuroso es un aditivo usado en los alimentos desde la antigüedad. Su efecto antimicrobiano es ejercido contra microorganismos especialmente en los mostos, su espectro de acción incluye mohos, levaduras y bacterias. Es especialmente eficaz en medio ácido. Ayuda a evitar la oxidación de los materiales, de modo que actúa sobre las enzimas llamadas oxidasas; su efecto básicamente radica en la ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas, haciendo que se inactiven las enzimas. (González-Cruz, 2008).

#### **2.2.5.2 Tipo de acción de los antimicrobianos**

Los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre los microorganismos:

1. Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
2. Daño a la integridad de la membrana.
3. Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Consecuentemente algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbiocidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos (García, M. 2004).

### **2.2.5.2.1 Acción de los antimicrobianos sobre los microorganismos**

La acción de los antimicrobianos sobre las células de los microorganismos en la conservación de alimentos está basada en una gran variedad de efectos individuales, dentro de las que se incluyen mecanismos físicos, fisicoquímicos y reacciones bioquímicas de la célula afectada. Algunas veces diversos factores individuales pueden producir un efecto tanto acumulativo como de bloqueo. Entre dichos factores se encuentran:

1. Interferencia con la membrana celular, destruyendo su carácter semipermeable, inhibiendo así el intercambio metabólico del microorganismo con el medio.
2. Disminución de las actividades enzimáticas, al afectar la naturaleza de las proteínas o al producirse una inhibición competitiva por combinación del antimicrobiano con el grupo activo de la enzima.
3. Daño en el mecanismo genético. Donde la célula pierde su capacidad de reproducción; algunas veces causa mutaciones que interfieren en su crecimiento (Alfaro, B. 2005).

### **2.2.6 Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana se mide determinando la cantidad más pequeña del agente antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un organismo control, esto es conocido como concentración mínima inhibitoria (CMI) (Andrews, J. 2001).

Los métodos que permiten la determinación de la actividad antimicrobiana pueden ser manuales, semi automatizados y automatizados (Hidalgo, M.2004).

Los métodos manuales pueden ser cualitativos o cuantitativos. Son cualitativos si sólo suministran información sobre la sensibilidad de la cepa en estudio: Si es sensible, resistente o intermedio. Los métodos cuantitativos, informan acerca de sensible, intermedio o resistente, pero mencionan adicionalmente, cuán sensible o resistente es el agente bacteriano en estudio. (Hidalgo, M.2004).

Los métodos semi automatizados o automatizados, se clasifican como métodos cualitativos, pero en realidad suministran una aproximación de la sensibilidad del agente. Dicen si son sensibles, intermedios o resistentes, pero la medición de estas categorías no es tan exacta como las obtenidas por métodos manuales (Hidalgo, M.2004).

Dentro de los métodos manuales, existe la técnica de difusión en agar o placa, la técnica de dilución en agar y la técnica de microdilución o dilución en tubo. Esta última técnica, puede ser realizada en tubo, en placas plásticas de microtitulación o empleando la técnica del Epsilon Test (Hidalgo, M.2004).

Para determinar la CMI por la técnica de dilución en tubo, se prepara una serie de tubos, cada uno de los cuales contiene medio con una concentración diferente del agente, y se inoculan todos los tubos de la serie. Después de la incubación, se observan los tubos que no presentan crecimiento (indica la presencia de turbidez visible o un solo botón sedimentado) y se determina así la CMI (Fernández, C *et al* G. 1998).

Para la técnica de difusión en agar, se prepara una placa que contenga un medio con agar y se inocula cantidades conocidas del agente antimicrobiano a pequeños discos de papel filtro, que luego se coloca en la superficie del agar. Durante la incubación, el agente difunde desde el papel, cuanto más se aleja, mayor es la concentración del agente. Se ha creado por tanto una zona de inhibición y el diámetro de esta zona es proporcional a la cantidad de agente antimicrobiano añadido y a la efectividad del agente (Andrews, J. 2001).

Los distintos procedimientos y sustancias antimicrobianas, manifiestan su forma de acción de distinto modo. Una célula normal, posee múltiples enzimas indispensables para los procesos metabólicos. La membrana citoplasmática mantiene la integridad del contenido celular; esta membrana regula el paso de sustancias que entran o salen de la célula al medio externo e incluso es el sitio donde reaccionan algunas enzimas. La pared celular proporciona a la célula una cobertura protectora, además, de participar en los procesos fisiológicos. El daño en alguna de estas estructuras inicia las alteraciones que lleva a la muerte celular. Es necesario tener en cuenta que hay muchos sitios vulnerables en la célula

y que el daño lo causa una o más de una variedad de agentes (Pulido, J. y Valderrama, J. 2007).

### **2.3 Uso de antimicrobianos en industrias alimenticias**

Los preservativos con actividad antimicrobiana juegan un papel muy importante en las industrias alimenticias ya que su finalidad es proteger de manera química o natural a los productos contra varios tipos de contaminación microbiana.

Giese (1994) y Davidson (1996) mencionan que la seguridad de los alimentos se incrementa y se mantiene mediante el uso de compuestos antimicrobianos, ya que estas sustancias se añaden a los alimentos para prevenir la descomposición microbiana. Davidson (1996) define a los antimicrobianos como compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y que por lo tanto, detienen el deterioro de la calidad y seguridad del alimento en el cual se encuentran.

Las industrias de alimentos son las principales interesadas en controlar la población indeseable que puedan alterar o dañar las características del alimento, de manera que sustancias como el metabisulfito de sodio son empleadas como conservantes. Sin embargo el empleo de este tipo de sustancias debe depender de las características del alimento, y de los efectos que pueda ejercer el preservante en el producto, como olor, sabor y textura, además de efectos secundarios en los consumidores. De modo que la preservación de productos alimenticios, se basa fundamentalmente en los efectos que puede tener el producto sobre el consumidor.

### 3. FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

#### 3.1 Formulación del problema

Debido al carácter alergénico del metabisulfito de sodio, su uso para el control de microorganismos contaminantes fue suspendido, generando la necesidad de sustituir dicha sustancia por otro agente antimicrobiano que permita eliminar las levaduras contaminantes del proceso de producción de ácido cítrico.

#### 3.2 Justificación

La fermentación de ácido cítrico es un proceso industrial susceptible a la contaminación con levaduras, donde su aparición da como resultado pérdidas económicas que se ven evidenciadas en la disminución de la eficiencia y productividad del proceso.

Por tal motivo es indispensable controlar el crecimiento de dichos microorganismos mediante el uso de antimicrobianos, como el metabisulfito de sodio; pero su carácter alergénico indica la necesidad de sustituirlo por otro antimicrobiano que posea un espectro de acción similar, y que al mismo tiempo resulte ser una opción económica para la empresa.

De acuerdo con lo anterior, la evaluación del ácido sórbico, el ácido benzoico, el sorbato de potasio, y el benzoato de sodio, resulta ser una alternativa importante en la búsqueda y selección de un sustituto apropiado en el control de los dos tipos de levaduras contaminantes del proceso de ácido cítrico (identificadas previamente como *Sacharomyces cerevisiae* y *Candida glabrata*).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar la eficacia del ácido benzoico, ácido sórbico, sorbato de potasio y benzoato de sodio, para contrarrestar el crecimiento de levaduras contaminantes en un proceso de producción de ácido cítrico.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Aislar e identificar bioquímicamente las dos especies de levaduras contaminantes del proceso de producción de ácido cítrico.
2. Determinar la efectividad del ácido benzoico, ácido sórbico, sorbato de potasio y benzoato de sodio, a través del método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), para inhibir el crecimiento de las levaduras aisladas.
3. Determinar la Concentración Mínima Microbicida (CMM) mediante ensayos en columnas de burbujeo simulando condiciones de proceso, para posteriormente ser aplicados al proceso de planta.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Ubicación y diseño de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la planta de ácido cítrico de SUCROMILES S.A., empresa biotecnológica ubicada en la recta Cali-Palmira Km. 18. Departamento Valle del Cauca, Colombia.

Dentro del desarrollo experimental se utilizaron tres cepas de levaduras. Dos de ellas fueron aisladas del proceso de producción de ácido cítrico (tanque de sustrato y tanque de fermentación). La tercera cepa utilizada en los ensayos realizados a nivel de laboratorio como parámetro de referencia, fue obtenida a partir de una muestra comercial de levadura seca activa para destilería “*S. cerevisiae*”.

La experimentación se dividió en 3 etapas, así:

- Primera etapa: Aislamiento e identificación de las dos cepas a evaluar, levadura de sustrato y levadura de fermentación.
- Segunda etapa: Determinación del efecto inhibitorio de los antimicrobianos evaluados mediante el método de concentración mínima inhibitoria (CMI), a partir de las técnicas de difusión en placa y dilución en tubo a nivel de laboratorio.
- Tercera etapa: Evaluación del uso de los antimicrobianos en una fermentación en columnas de burbujeo, simulando las condiciones de planta en los momentos de contaminación del proceso. Estos ensayos no fueron realizados para la cepa comercial (*S.cerevisiae*), al no ser esta una cepa contaminante del proceso.

Para el diseño experimental y su posterior interpretación se manejaron condiciones constantes entre ensayos, operando entre estos solo un tipo de variable que permitiera

facilitar la interpretación de los resultados. De igual forma también se usaron controles positivos y negativos para confirmar la veracidad de los resultados.

## **5.2 MÉTODOS**

### **5.2.1 Toma de muestra**

El muestreo se realizó bajo condiciones de esterilidad en cada tanque (sustrato, fermentador), se abrió la línea de vapor del punto de toma de muestra de cada tanque, se drenó vapor durante dos minutos, se cerró la válvula de vapor y se adicionó alcohol al 90%, se abrió la válvula de salida del tanque, se drenó el producto del tanque durante 1 minuto y se tomó la muestra.

### **5.2.2 Obtención y aislamiento de cepas.**

A partir del muestreo, se realizaron dos siembras de tipo masivo en agar selectivo para levaduras YM (levadura maltosa agar), a partir de la dilución  $10^{-1}$ , fueron incubadas por un período de 48 horas a 32°C. Posteriormente se realizaron 3 aislamientos consecutivos de las colonias de levaduras contaminantes manteniendo los mismos parámetros de incubación y utilizando agar YM como medio de cultivo.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada como control fue obtenida de una muestra comercial de levadura seca activa para destilería (Anexo A). La recuperación de la cepa se realizó suspendiendo 10g de la muestra comercial en 90 ml agua peptonada. A partir de dicha suspensión se realizó una siembra de tipo masivo en agar YM y se sometieron a incubación por 48 horas a 32°C.

### **5.2.3 Selección del medio de cultivo**

Se realizaron aislamientos de las 3 levaduras a evaluar en medios selectivos para levaduras, (YM: agar levadura maltosa, SB: agar sabouraud y PDA: agar papa dextrosa. Anexo B). Por un periodo de incubación de 48 horas a 32°C.

El criterio de selección del medio de cultivo a emplear para los ensayos, se basó en la diferenciación de morfología macroscópica y microscópica de las levaduras en cada uno de los medios de cultivo.

#### **5.2.4 Conservación de cepas**

Se realizó un banco de 80 viales, de los cuales 40 corresponden a la levadura aislada del tanque de sustrato, y los 40 restantes a la levadura aislada del tanque de fermentación; se mezcló suspensión de levadura con caldo SB y glicerol al 30%v/v. Los viales se conservaron y almacenaron a una temperatura de -5°C en nevera.

A la cepa de *S. cerevisiae* utilizada como control, no se le realizó conservación en glicerol debido a que se encontraba en forma de levadura seca activa.

#### **5.2.5 Identificación de levaduras**

Se realizó identificación bioquímica de las cepas aisladas a través del método de “MicroScan WalkAway plus System” en un laboratorio externo

#### **5.2.6 Preparación del inóculo**

Se preparó un inóculo a partir de la recuperación de un vial de cada cepa aislada, en un volumen efectivo de trabajo 270ml, tanto para la cepa obtenida de los tanques de fermentación como para la cepa aislada de los tanques de sustrato.

Para la cepa comercial de *S. cerevisiae*, se resuspendió la muestra comercial en agua peptonada, luego se tomó una alícuota de la suspensión y fue transferido a de caldo SB; se incubó durante de 24 horas a 32°C, de la anterior suspensión se inocularon una alícuota en de caldo SB en un volumen efectivo de trabajo de 270ml.

El crecimiento microbiano de las 3 cepas evaluadas, fue monitoreado cada hora desde la hora 0 hasta la hora 8, mediante recuento en cámara de Newbauer y siembra en placa como método confirmatorio. Se determinó el tiempo en el cual se alcanza una población

de  $1 \times 10^6$  UFC/ml como población estándar, para los ensayos de dilución en tubo y pruebas en columnas de burbujeo.

### 5.2.7 Pruebas de CMI (concentración mínima inhibitoria)

Para la determinación de la CMI a nivel de laboratorio, se evaluaron los antimicrobianos (benzoato de sodio, sorbato de potasio, ácido benzoico y ácido sórbico), junto al control positivo del estudio (metabisulfito de sodio) mediante las técnicas de difusión en placa (tabla 1) y dilución en tubo (tabla 2), las concentraciones fueron elegidas según estudios previos (Castell-Perez, *et al.* 2007) además de tener en cuenta la toxicidad de cada uno de ellos (Anexo E). Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron evaluados mediante la utilización de caldo y agar SB según el caso.

Los antimicrobianos fueron disueltos en agua pH 2.0 para simular las condiciones de acidez del proceso, las concentraciones empleadas fueron determinadas según el ensayo correspondiente (ver tablas 1 y 2).

Tabla1. Ensayos para difusión en placa

Ensayo	Concentración de antimicrobianos (ppm)				
	Benzoato de sodio	Sorbato de potasio	Ácido benzoico	Ácido sórbico	Metabisulfito de sodio
1	1400	1400	1400	1400	1400
	1200	1200	1200	1200	1200
	1000	1000	1000	1000	1000
	800	800	800	800	800
	700	700	700	700	700
2	600	600	600	600	600
	500	500	500	500	500
	400	400	400	400	400
	300	300	300	300	300
	200	200	200	200	200
3	800	800	800	800	800
	700	700	700	700	700
	600	600	600	600	600
	500	500	500	500	500
	400	400	400	400	400

Tabla 2. Ensayo de dilución en tubo

Ensayo	Concentración de antimicrobianos (ppm)				
	Benzoato de sodio	Sorbato de potasio	Ácido benzoico	Ácido sórbico	Metabisulfito de sodio
1	1400	1400	1400	1400	1400
2	1200	1200	1200	1200	1200
	1000	1000	1000	1000	1000
	800	800	800	800	800
	600	600	600	600	600
	400	400	400	400	400
3	200	200	200	200	200
	100	100	100	100	100
	50	50	50	50	50
	30	30	30	30	30
	10	10	10	10	10
4	400	400	400	400	400
	300	300	300	300	300
	200	200	200	200	200
	100	100	100	100	100
	50	50	50	50	50

### 5.2.7.1 Difusión en placa:

Se utilizó la técnica de Gauze (Howard, B. 1997). Se realizó la inoculación (0.1 ml) por siembra masiva de las levaduras en suspensión que se encontraban en una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ml antes de su adición en agar SB (dicha concentración fue confirmada por medio de recuento en cámara de Newbauer). Posteriormente se ubicaron pozos de aproximadamente 5mm de diámetro y se adicionaron 50  $\mu$ l de la solución de antimicrobiano con la concentración a evaluar, se llevó a incubar a 32°C y se realizó la lectura a las 48 horas. Para la lectura de las cajas y posterior determinación de la CMI se tuvo en cuenta la presencia de halos de inhibición mayores o iguales a 0,5cm (sin incluir el diámetro del pozo).

### **5.2.7.2 Dilución en tubo:**

Debido a la variabilidad de los resultados presentados en la técnica de difusión en placa, se decidió determinar la CMI mediante la técnica de dilución en tubo.

Se realizaron cuatro ensayos consecutivos, con el fin de determinar la CMI de cada antimicrobiano evaluado (benzoato de sodio, sorbato de potasio, ácido benzoico, ácido sórbico y metabisulfito de sodio), como se muestra en la tabla 2.

Para cada ensayo, se adicionaron 5 ml de una suspensión de levaduras en concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, a tubos que contenían 5 ml de caldo SB y el respectivo antimicrobiano en las concentraciones indicadas en la tabla 2; la población final obtenida en cada tubo fue de  $5 \times 10^5$  células/ml. Se montaron tubos de control positivo (tubo con metabisulfito) y control negativo (tubo sin antimicrobiano y sin levadura). Los tubos se llevaron a incubar a 32°C durante 48 horas. Luego se realizó la lectura teniendo en cuenta la presencia o ausencia de turbidez (Fernández, C. *et al.* 1998). Cada ensayo se realizó por triplicado.

De los tubos sin turbidez se sembraron en superficie 0.1ml de la solución en cajas con medio SB. Se incubaron a 32°C durante 48 horas, al cabo de las cuales se determinó la CMI, correspondiente a la concentración que alcanzó a mostrar inhibición, evidenciada por la ausencia de turbidez.

La CMM (concentración mínima microbicida), se estableció como la concentración de antimicrobiano capaz de inhibir totalmente el crecimiento de levaduras, evidenciada por la ausencia de crecimiento en las siembras realizadas luego del periodo de incubación.

### **5.2.8 Ensayo en columnas de burbujeo:**

Una vez seleccionada la concentración de cada uno de los antimicrobianos a evaluar (benzoato de sodio, sorbato de potasio, ácido benzoico y ácido sórbico), de acuerdo con los resultados de las pruebas realizadas con anterioridad, se procedió con el montaje de ensayos en columnas de burbujeo. Se utilizaron licores fermentados y se transfirieron a

las columnas (6 o 12 según el ensayo) de un volumen efectivo de trabajo de 3 litros, se simularon las condiciones de proceso donde es susceptible la contaminación (temperatura y flujo de Aire). Se contaminó cada columna con las levaduras de evaluación hasta obtener una población de  $1 \times 10^6$  células/ml. Por último se adicionó cada antimicrobiano a las concentraciones establecidas de acuerdo al ensayo de manera simultánea (ver tabla 3).

Tabla 3. Ensayos en columnas de burbujeo

Ensayo	CONCENTRACIÓN DE ANTIMICROBIANOS (ppm)				
	Benzoato de Sodio	Sorbato de potasio	Ácido Benzoico	Ácido sórbico	Metabisulfito de sodio
1	200	300	300	300	300
2	***	***	400 y 500	400 y 500	***

Se tomaron muestras de cada uno de las columnas de burbujeo a la hora 0, 1, 2, 6, 12, 18 y 24. A cada muestra se le realizó recuento en cámara de Nuebauer (cuatro veces por muestra), además de realizar siembra en placa (por duplicado, manejando dos diluciones).

### 5.3 Recolección de la información:

Debido a que la investigación es de tipo experimental, la recolección de la información se llevo a cabo de forma paralela a los ensayos realizados, los datos arrojados para cada uno de ellos, se codificaron con el fin de facilitar su tabulación como se muestra a continuación:

Benzoato de sodio (B)

Sorbato de potasio (S)

Ácido benzoico (AB)

Ácido sórbico (AS)

Metabisulfito de sodio (M)

#### **5.4 Análisis de la información:**

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para todos los datos obtenidos en los ensayos pilotos con el fin de evidenciar si hay o no diferencia significativa entre cada uno de los antimicrobianos evaluados con respecto a las levaduras *C. glabrata* y *S. cerevisiae* (obtenidas de los tanques de fermentación y el tanque de sustrato respectivamente); adicionalmente cuando se presentaron diferencias significativas, se realizaron pruebas de comparación múltiple (prueba de Tukey), con el fin de determinar cuál de los antimicrobianos probados presenta un mejor efecto inhibitorio a través del tiempo.

Para el análisis de los datos evaluados fueron analizados estadísticamente con el software R (2004, versión 2.0.2); para lo cual, cada uno de los casos (antimicrobiano/hora de exposición) fue analizado por separado.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Obtención, aislamiento e identificación de cepas

#### 6.1.1 Cepa obtenida a partir de la etapa de fermentación

En la tabla 4 se describe la morfología macroscópica y microscópica de la levadura aislada del tanque de fermentación en medio YM.

Tabla 4. Descripción de levadura aislada de tanque de fermentación.

<b>Medio</b>	<b>Características Macroscópicas</b>	<b>Características Microscópicas</b>
<b>YM</b>	Colonias blancas, cremosas, opacas, con bordes irregulares y pequeñas.	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas. Estructuras con aspecto ovoide y grueso.

Fotografía 1. Aislamiento en agar YM de la levadura aislada en la etapa de fermentación.



Fuente: Autoras

### 6.1.2 Cepa obtenida a partir del tanque de sustrato

La tabla 5 muestra la descripción macroscópica y microscópica de la levadura aislada del tanque de sustrato en agar YM, a partir de la siembra directa.

Tabla 5. Descripción de levadura aislada de tanque de sustrato.

<b>Medio</b>	<b>Características Macroscópicas</b>	<b>Características Microscópicas</b>
<b>YM</b>	Colonias blancas, cremosas, circulares, con bordes regulares, puntiformes y de gran tamaño.	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas. Estructuras con aspecto ovoide.

Fotografía 2. Aislamiento en agar YM de la levadura aislada del tanque de sustrato.



Fuente: Autoras

### 6.1.3 Recuperación de la cepa control, *S. cerevisiae* (muestra comercial)

La descripción macroscópica y microscópica de la re-suspensión de la muestra comercial se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Descripción de la levadura control (*S. cerevisiae*).

<b>Medio</b>	<b>Características Macroscópicas</b>	<b>Características Microscópicas</b>
<b>YM</b>	Colonias blancas, cremosas, circulares, con bordes regulares y puntiformes	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas. Estructuras con aspecto ovoide

Fotografía 3. Aislamiento en agar YM para *S.cerevisiae* (muestra comercial).



Fuente: Autoras

Como se muestra en la tabla 5 y 6, las características morfológicas tanto macro como microscópicas de la cepa aislada del tanque de sustrato y la cepa obtenida a partir de la muestra comercial son similares. Esto era de esperarse, ya que debido a estudios de identificación realizados previamente en la empresa se había determinado que la levadura encontrada en el tanque de sustrato correspondía a *S. cerevisiae*; de igual forma, mediante el mismo estudio fue determinada la presencia de *Cándida glabrata* como la levadura contaminante de la etapa de fermentación; datos que fueron confirmados en el presente estudio mediante la identificación realizada por un laboratorio externo (Anexo C).

Así mismo, si se comparan las características morfológicas de la levadura aislada en la etapa de fermentación (tabla 4), con lo expuesto por Torres, J. *et al* (2000) en donde reportan como características microscópicas propias de *C. glabrata*, estructuras individuales ovoides, capaces de formar cadenas cortas de levaduras, con gemación

multilateral, se confirma nuevamente la presencia de esta levadura, sin embargo el artículo nombrado también menciona entre sus características macroscópicas colonias lisas de consistencia blanda y de color crema, que resultan ser diferentes a las observadas en el aislamiento, por lo tanto se puede decir que probablemente la cepa ha sufrido un proceso de adaptación debido al medio en el cual se encuentra, y puede ser considerada como una cepa contaminante autóctona del proceso.

Por otra parte, la presencia de dos cepas diferentes, en partes aisladas del proceso, se debe probablemente a las condiciones de los mismos; donde la cepa de *S.cerevisiae*, obtenida en el tanques de sustrato permanece en un medio azucarado, que antes de su utilización es sometido a un proceso de pasteurización capaz de eliminarlas casi en su totalidad, sin embargo, si estas llegasen al proceso de fermentación las mismas condiciones del medio podrían inhibir su crecimiento. En tanto que la cepa de *C. glabrata*, aislada en la etapa de fermentación, se caracteriza por estar adaptada a las condiciones de acidez del mismo; motivo por el cual cuando estas se presentan se ve la necesidad de eliminarla mediante la adición de alguna sustancia inhibitoria.

## 6.2 Selección del medio de cultivo

La tabla 7 muestra la descripción macroscópica y microscópica luego de la siembra en los medios YM, SB y PDA para la selección del medio de cultivo más adecuado durante el estudio

Tabla 7. Características macroscópicas y microscópicas de las tres cepas evaluadas en diferentes medios de cultivo.

		MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS		
CEPA	Características	PDA	YM	SB
<i>C. glabrata</i>	Macroscópicas	Colonias blancas, cremosas, opacas con bordes irregulares y con apariencia volcánica.	Colonias blancas, cremosas, opacas con bordes irregulares y con apariencia volcánica. Presentan menor tamaño que el observado en PDA y	Colonias blancas, cremosas, opacas con bordes irregulares y con apariencia volcánica. Presentan mayor tamaño que el observado en PDA y

			SB	YM
	<b>Microscópicas</b>	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño
<i>S. cerevisiae</i>	<b>Macroscópicas</b>	Colonias blancas, cremosas, brillantes y con bordes regulares. No es puntiformes.	Colonias blancas, cremosas, brillantes, con bordes regulares. Presentan menor tamaño que el observado en PDA y SB	Colonias blancas, cremosas, brillantes, con bordes regulares y puntiformes.
	<b>Microscópicas</b>	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño
<i>S. cerevisiae</i> Muestra comercial	<b>Macroscópicas</b>	Colonias blancas, cremosas, brillantes, con bordes regulares y puntiforme.	Colonias blancas, cremosas, brillantes, con bordes regulares y puntiformes. Presentan menor tamaño que el observado en PDA y SB	Colonias blancas, cremosas, brillantes, con bordes regulares y puntiformes.
	<b>Microscópicas</b>	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño	Estructuras levaduriformes que se tornan Gram positivas con aspecto ovoide de gran tamaño

La diferencia morfológica obtenida en los tres medios de cultivo, se debe principalmente a la composición de cada uno; el agar YM por ejemplo, es el medio más complejo de los tres (ver anexo B), ya que está diseñado especialmente para microorganismos acidofílicos, razón por la cual, crecimiento de las colonias es menor al observado tanto en agar PDA como en agar SB, exceptuado para la levadura aislada del tanque de sustrato, ya que aunque en este medio, se presenta un mayor tamaño de las colonias, no se observa su aspecto puntiforme.

De igual forma, al comparar los medios de cultivo, se encontró que el SB resulta ser el más útil, debido a que permitió una mayor diferenciación entre las colonias de las tres levaduras evaluadas. El PDA, no fue seleccionado debido a que tiene como inconveniente el no permitir una buena diferenciación de las especies motivo del estudio.

Es por esto, que a partir de los datos reportados en las tabla 7 se pudo determinar que para los 3 casos el medio donde se presenta una morfología más detallada y de mayor tamaño, es en el agar SB, por lo cual, dicho medio fue el seleccionado para los posteriores ensayos de laboratorio.

### 6.3 Determinación del inóculo

A continuación se presentan los resultados de las curvas de crecimiento obtenido para cada levadura:

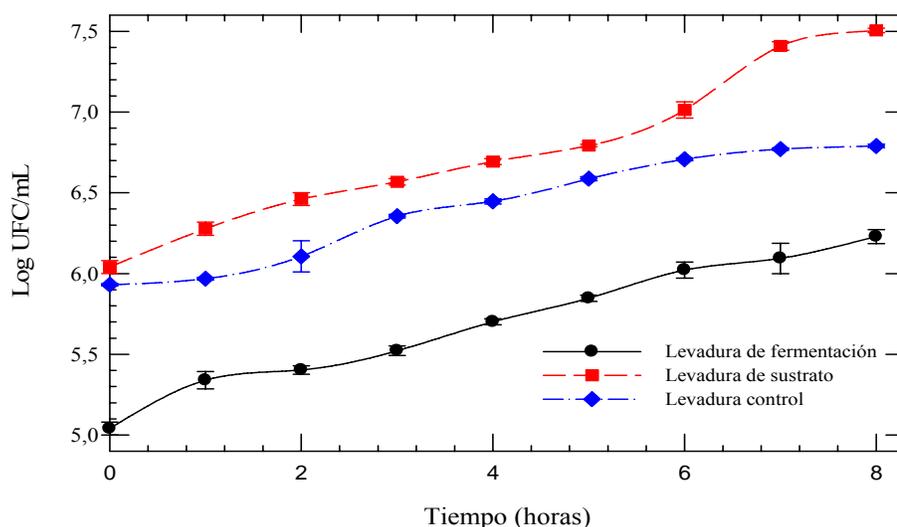


Figura 3. Gráfico curvas de crecimiento de 8 horas para las tres levaduras evaluadas.

Las 3 cepas evaluadas bajo las condiciones del estudio presentaron un crecimiento logarítmico hasta la hora 8; hora en la cual se evidenció una población de  $2,1 \times 10^6$  células/ml para la levadura aislada de la etapa de fermentación,  $3,5 \times 10^7$  células/ml para la

levadura proveniente del tanque de sustrato y  $6,8 \times 10^6$  células/ml para la levadura control (*S. cerevisiae*, muestra comercial) mediante el respectivo recuento en cámara de Neubauer, tal y como se muestra en el anexo C.

De igual forma, mediante las curvas obtenidas se pudo establecer el tiempo de cultivo requerido para que cada una de las levaduras evaluadas lograra una población estimada de  $1 \times 10^6$  células/ml ya que esta es necesaria para la realización de ensayos posteriores.

La cepa proveniente de la etapa de fermentación mostró que la población requerida se obtenía a la hora 6, presentando un recuento de  $1,4 \times 10^6$  células/ml, la levadura de sustrato inicia la curva con la población requerida (hora 0) con un recuento de  $1,0 \times 10^6$  células/ml y la levadura control correspondiente a la muestra comercial, *S. cerevisiae*, a las 2 horas de realizada la curva, que es donde se observa una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/ml.

La diferencia de crecimiento presentada para las tres levaduras de prueba, puede deberse a la matriz del ensayo, ya que esta solo consta de caldo SB, razón por la cual *C. glabrata* presenta el crecimiento más lento, al estar adaptada a condiciones nutricionales más exigentes; de igual forma al comparar el crecimiento obtenido por las dos cepas de *S. cerevisiae*, se observa que la cepa obtenida a partir del tanque de sustrato es la que presenta el mayor crecimiento poblacional a través del tiempo, debido a que bajo las condiciones del proceso esta cepa se encuentra en una matriz nutricional bastante básica, y por lo mismo, durante la realización del ensayo, no se observa que los componentes del medio influyan en su crecimiento. Por último, la cepa control presentó un crecimiento más lento al observado por la cepa aislada de sustrato, lo cual pudo ocurrir al no encontrarse bajo las condiciones requeridas en los procesos de destilería para los cuales es comercializada.

## **6.4 Pruebas de CMI (Concentración mínima inhibitoria)**

### **6.4.1 Difusión en agar:**

La CMI establecida por el método de difusión en agar para cada uno de los antimicrobianos probados con respecto a las levaduras del estudio se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Determinación de CMI por método de difusión en placa.

<b>LEVADURA DE FERMENTACIÓN (<i>C.glabrata</i>)</b>					
<b>Concentración (ppm)</b>	<b>ANTIMICROBIANOS</b>				
	<b>Benzoato de Sodio</b>	<b>Sorbato de Potasio</b>	<b>Ácido Benzoico</b>	<b>Ácido Sórbico</b>	<b>Metabisulfito de sodio</b>
	<b>Halo de inhibición (cm)</b>				
<b>1400</b>	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0	>2,0
<b>1200</b>	>2,0	>2,0	>2,0	1,7	>2,0
<b>1000</b>	2,0	1,9	1,8	1,3	2,0
<b>800</b>	1,7	1,6	1,4	0,9	1,6
<b>700</b>	1,4	1,2	1,2	0,6	1,2
<b>600</b>	1,3	1	0,9	<b>0,5</b>	1
<b>500</b>	1,1	<b>0,9</b>	<b>0,5</b>	0,4	<b>0,9</b>
<b>400</b>	<b>0,6</b>	0,1	0,4	0,2	0,3
<b>300</b>	0,2	0	0,1	0	0
<b>200</b>	0	0	0	0	0
<b>Control</b>	0	0	0	0	0
<b>LEVADURA DE SUSTRATO (<i>S. cerevisiae</i>)</b>					
<b>Concentración (ppm)</b>	<b>ANTIMICROBIANOS</b>				
	<b>Benzoato de Sodio</b>	<b>Sorbato de Potasio</b>	<b>Ácido Benzoico</b>	<b>Ácido Sórbico</b>	<b>Metabisulfito de sodio</b>
	<b>Halo de inhibición (mm)</b>				
<b>1400</b>	>2,0	>2,0	>2,0	2,0	2,0
<b>1200</b>	2,0	1,7	>2,0	1,6	1,5
<b>1000</b>	1,5	1,2	1,7	1,1	1,1
<b>800</b>	1,1	0,6	1,2	0,6	<b>0,7</b>
<b>700</b>	0,8	<b>0,5</b>	1	<b>0,5</b>	0,4
<b>600</b>	<b>0,6</b>	0,4	0,9	0,3	0,3
<b>500</b>	0,3	0,3	0,7	0,2	0,2
<b>400</b>	0,2	0,2	<b>0,5</b>	0,2	0,1
<b>300</b>	0	0	0,2	0	0
<b>200</b>	0	0	0	0	0
<b>Control</b>	0	0	0	0	0
<b>LEVADURA CONTROL (<i>S. cerevisiae</i>)</b>					
<b>Concentración (ppm)</b>	<b>ANTIMICROBIANOS</b>				
	<b>Benzoato de Sodio</b>	<b>Sorbato de Potasio</b>	<b>Ácido Benzoico</b>	<b>Ácido Sórbico</b>	<b>Metabisulfito de sodio</b>
	<b>Halo de inhibición (mm)</b>				
<b>1400</b>	>2,0	>2,0	2,0	>2,0	2,0
<b>1200</b>	1,7	1,6	1,5	1,8	1,6
<b>1000</b>	1,3	1,2	1,0	1,4	1,1
<b>800</b>	0,9	0,9	0,7	0,9	<b>0,6</b>

<b>700</b>	0,7	0,7	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	0,4
<b>600</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	0,3	0,4	0,2
<b>500</b>	0,4	0,3	0,2	0,3	0,1
<b>400</b>	0,2	0,2	0	0,1	0
<b>300</b>	0	0	0	0	0
<b>200</b>	0	0	0	0	0
<b>Control</b>	0	0	0	0	0

El dato en negrilla corresponde a la CMI.

Mediante los resultados obtenidos se pudo observar que el benzoato de sodio y el sorbato de potasio mostraron mayor efectividad para contrarrestar las levaduras de prueba.

*C. glabrata* muestra mayor sensibilidad frente a los antimicrobianos evaluados, especialmente para el benzoato de sodio, pues como se observa en la tabla 8, las concentraciones empleadas para generar un halo mayor o igual a 5mm son menores a las utilizadas por las dos cepas de *S. cerevisiae* (sustrato y control) y los demás antimicrobianos de prueba excepto para el ácido benzoico en comparación con la levadura proveniente del tanque de sustrato. De igual forma y como lo mencionó Al-Sa'ed, A. (1997), se comprobó que se requiere una mayor concentración de sorbato de potasio y benzoato de sodio para inhibir a *S. cerevisiae*.

Por otra parte, los efectos inhibitorios causados por el ácido sórbico y el ácido benzoico sobre las levaduras probadas, fue evidente, sin embargo su eficacia es menor con respecto al de las sales empleadas (benzoato de sodio y sorbato de potasio).

Entre las posibles causas de lo anterior se destaca la falta de difusión en el medio de los ácidos benzoico y sórbico, ya que las concentraciones empleadas de estos superan el punto de saturación de disolución en agua, según como se menciona en las fichas técnicas (anexo J), pues la solubilidad del ácido sórbico en agua es de 25mg de muestra en 100ml de agua a 20°C y para el ácido benzoico es de 20mg en 100ml en agua a 30 grados centígrados; es por eso que cuando la concentración es superior a la que permite su disolución, se presenta aglomeración de las partículas, causando la formación de cristales del ácido en el agua, los cuales impiden la difusión total de la sustancia en el medio de cultivo, ocasionando de este modo que el efecto de inhibición se vea disminuido, pues la solución que entra en contacto

con las levaduras es mínima si se le compara con el benzoato de sodio y el sorbato de potasio.

Debido a lo anterior, esta técnica fue invalidada al no obtenerse resultados significativos para los dos ácidos evaluados.

#### 6.4.2 Dilución en tubo:

A continuación en la tabla 9, se encuentran los resultados obtenidos del ensayo de CMI y CMM para cada una de las levaduras.

Tabla 9. Determinación de CMI Y CMM.

LEVADURA DE FERMENTACION										
CONCENTRACIÓN (ppm)	B		S		AB		AS		M	
	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Turb A \ P	Placa A \ P
1400	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1200	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1000	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
800	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
600	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
400	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>300</b>	A	A	A	A**	A	A**	A	A**	A	A**
<b>200</b>	A	A**	A*	P	A*	P	A*	P	A*	P
100	A*	P	P	P	P	P	P	P	P	P
50	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Control positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Control negativo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
LEVADURA DE TANQUE DE JARABE										
CONCENTRACIÓN (ppm)	B		S		AB		AS		M	
	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P
1400	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1200	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1000	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
800	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
600	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
400	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>300</b>	A	A	A	A**	A	A**	A	A**	A	A**

200	A	A**	A*	P	A*	P	A*	P	A*	P
100	A*	P	P	P	P	P	P	P	P	P
50	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Control positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Control negativo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<b>LEVADURA CONTROL (<i>S. cerevisiae</i>)</b>										
CONCENTRACIÓN (ppm)	B		S		AB		AS		M	
	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P	Placa A \ P	Tur A \ P
1400	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1200	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1000	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
800	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
600	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
400	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
300	A	A	A	A**	A	A**	A	A**	A	A**
200	A	A**	A*	P	A*	P	A*	P	A*	P
100	A*	P	P	P	P	P	P	P	P	P
50	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
30	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Control positivo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Control negativo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

B: Benzoato de sodio, S: orato de potasio, AB: Ácido benzoico, AS: Ácido sórbico, M: Metabisulfito de sódio. Tur: turbidez \*Concentración elegida como CMI. \*\* Concentración elegida como CMM. A: ausencia. P: presencia.

En los ensayos 1 y 2, correspondientes a las concentraciones de 1400 a 400 ppm para cada uno de los antimicrobianos mediante la técnica de dilución en tubo, se pudo determinar que efectivamente las sustancias empleadas inhibieron el crecimiento de las tres cepas evaluadas; pero al no evidenciarse crecimiento alguno, fue necesario realizar ensayos adicionales manejando concentraciones menores que permitieran determinar la concentración mínima a la cual los antimicrobianos evaluados empiezan a ejercer un efecto inhibitorio significativo para cada una de las levaduras estudiadas.

A partir de los siguientes ensayos (3 y 4), se pudo establecer que las cepas evaluadas empiezan a mostrar inhibición bajo los efectos del benzoato de sodio a partir de la

concentración de 100 ppm, donde se evidenció ausencia de turbidez pero crecimiento en placa, por lo cual para dicho antimicrobiano la concentración de 100 ppm fue seleccionada como la CMI, mientras que la CMM fue determinada para la concentración de 200 ppm debido a que en esta se evidencia ausencia de crecimiento tanto en tubo como en placa.

De igual forma, se pudo establecer que a nivel de laboratorio el sorbato de potasio, el ácido benzoico, el ácido sórbico y el metabisulfito de sodio comienzan a mostrar su efecto inhibitorio a partir de las 200 ppm, pues a esta concentración se observa ausencia de turbidez en los tubos pero se observa crecimiento en placa, por lo cual esta concentración es tomada como la CMI para cada uno de los antimicrobianos antes nombrados. La CMM fue determinada para la concentración correspondiente a 300 ppm debido a que es a partir de esta donde se evidencia ausencia total del crecimiento de las levaduras estudiadas (ver fotografía 4).



Fotografía 4. Técnica dilución en tubo Ensayo 2. *C. glabrata*.

En este punto es de vital importancia destacar el benzoato de sodio debido a que este tiene un impacto inhibitorio importante en el crecimiento de las levaduras de prueba a nivel de laboratorio, lo cual fue evidenciado al presentar una inhibición total de las levaduras a una menor concentración si se le compara con los otros antimicrobianos probados; lo anterior ocurre debido a que el benzoato de sodio es más efectivo que el sorbato de potasio cuando se manejan niveles bajos de pH, como en el caso del presente estudio, donde en los ensayos realizados se manejo un pH de 2,0; teniendo en cuenta lo anterior y según lo expuesto por Battey, A. et al (2005) donde se comenta que el sorbato de potasio tiene una interacción significativa con valores altos de pH, pero que tal interacción es inexistente entre el pH y benzoato de sodio, cuando el pH por si mismo no es capaz de controlar el crecimiento de

hongos descomponedores, es evidente la eficacia del benzoato en la inhibición de levaduras; de igual forma al comparar dicho antimicrobiano con los dos ácidos orgánicos de prueba (ácido benzoico y ácido sórbico), y tal como se muestra en el mismo estudio, el benzoato resulta ser más eficaz cuando se maneja un pH bajo ya que para que estos ácidos tengan un efecto significativo a medida que disminuye el pH es necesario aumentar la concentración de los mismos.

El metabisulfito de sodio, que es el control positivo del estudio debido a que con anterioridad fue utilizado por la empresa para contrarrestar el crecimiento de levaduras contaminantes en el proceso de producción de ácido cítrico, mostró un comportamiento similar al expuesto por el ácido benzoico, el ácido sórbico y el sorbato de potasio; pero tal como se expuso anteriormente, su efecto es inferior si se le compara con el obtenido por el benzoato de sodio.

Los resultados obtenidos por el método de difusión en placa, si se comparan con los resultados obtenidos con el método de dilución en tubo, resultan ser menos eficaces debido a que mediante el método de difusión en placa se observa la necesidad de emplear una concentración mayor para inhibir el crecimiento de las levaduras motivo del estudio, es por esto que la técnica de difusión en placa resulta ser menos efectiva, pues no permite una total interacción del antimicrobiano con las levaduras, bajo las condiciones del estudio y los antimicrobianos evaluados.

#### **6.5 Ensayo en columnas de burbujeo:**

De las concentraciones seleccionadas mediante el método de dilución en tubo, se probaron los antimicrobianos simulando las condiciones de la planta al final del proceso de fermentación para confirmar su efecto inhibitorio. Los resultados se muestran a continuación. (Ver anexo F y G).

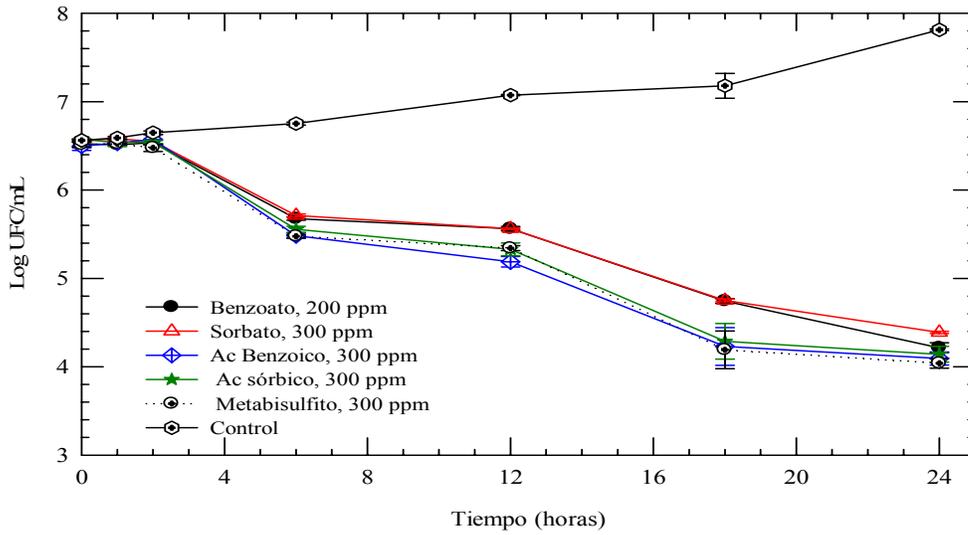


Figura 4. Ensayo 1 en columna. Grafica *C. glabrata*.

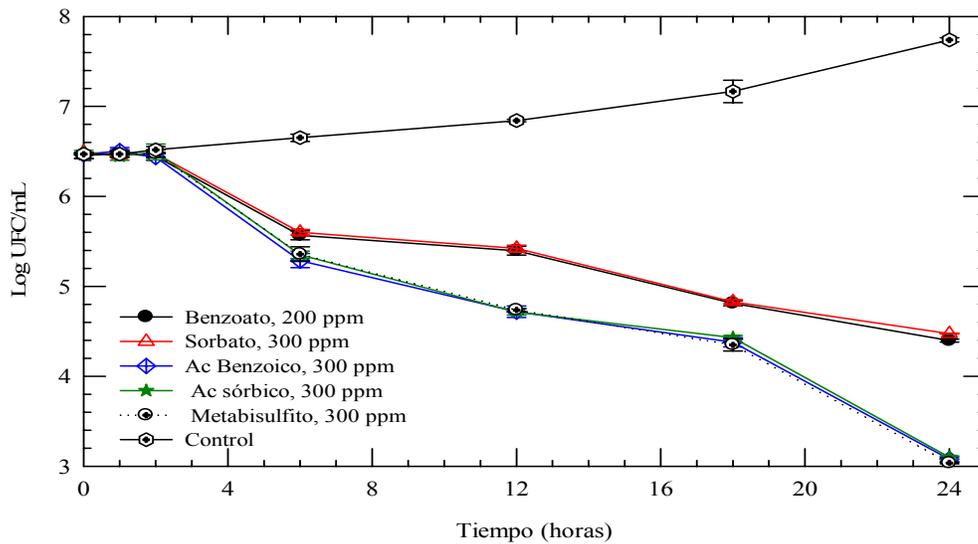


Figura 5. Ensayo 1 en columna. Grafica *S. cerevisiae*.

De acuerdo a los datos registrados en los anexos F y G y las figuras 4 y 5 las concentraciones elegidas según las pruebas a nivel de laboratorio, no fueron lo suficientemente eficaces para el contrarrestar el crecimiento de las levaduras, pues aunque se observa una diferencia poblacional significativa entre los controles del ensayo y las

columnas con antimicrobiano, a las 24 horas de exposición dicho decrecimiento solo fue de dos unidades logarítmicas, razón por la cual mediante este ensayo no se pudo determinar la CMM al no presentarse un decrecimiento total de las levaduras contaminantes; esto se le atribuye a la matriz del ensayo, pues cuando se evaluaron las concentraciones mediante la técnica de dilución en tubo, esta solo estaba constituida por el medio de cultivo y el antimicrobiano de prueba, mientras que en los ensayos realizados en las columnas de burbujeo entra un factor adicional que es la presencia de biomasa fúngica, que al igual que las levaduras se ve afectada por la presencia del antimicrobiano, entonces, al haber un incremento en la población microbiana las concentraciones empleadas resultan ser ineficaces para eliminar el total de levaduras.

Al comparar el control positivo (metabisulfito de sodio) con los antimicrobianos de prueba, se pudo determinar que el efecto de este resulta similar al obtenido por el ácido benzoico y el ácido sorbico, datos que fueron confirmados mediante el estudio estadístico realizado; es por esto que en los ensayos posteriores no fue necesario su montaje.

De igual forma, a pesar de que el benzoato de sodio es uno de los inhibidores más efectivos para contrarrestar el crecimiento de levaduras cuando el pH es menor a 4.5, al realizar los estudios a escala piloto (Anexo F y G), esta sal al igual que el sorbato de potasio ejercieron un efecto inhibitorio menor al obtenido por los dos ácidos evaluados, lo cual fue evidenciado por la poca disminución de la población de levaduras bajo su efecto y confirmado mediante pruebas estadísticas de comparación múltiple (prueba de tukey); por lo cual el uso de las mismas para contrarrestar el crecimiento de las levaduras *C. glabrata* y *S. cerevisiae* fue descartado y excluido de los ensayos posteriores.(ver figura 6).

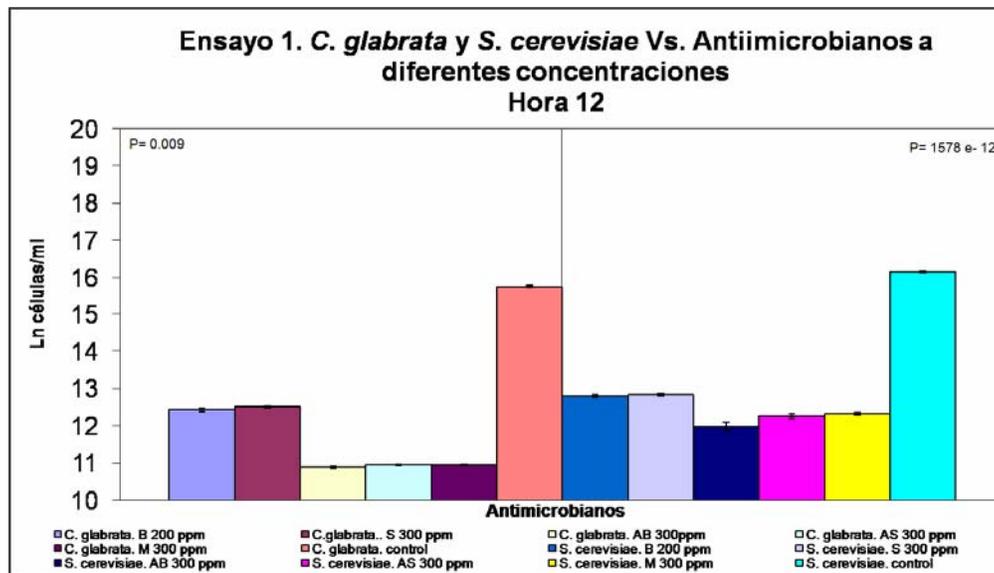


Figura 6. Ensayo 1 en columna. *C. glabrata* y *S. cerevisiae* Vs. Antimicrobianos a diferentes concentraciones. Hora 12 de exposición.

Por otra parte, es importante destacar que después de la hora 2 de exposición, es donde se empieza a evidenciar el efecto de los antimicrobianos de prueba, pues es a partir de esta hasta la hora 6 que se inicia el decrecimiento poblacional más significativo del ensayo, representado por la disminución poblacional en una unidad logarítmica; de la misma forma, de la hora 6 en adelante dicho efecto es menor, ya que se observa nuevamente la disminución de una unidad logarítmica hasta la hora 18 y de la hora 18 a la 24 aunque se sigue evidenciando la acción de los antimicrobianos de prueba, esta se da en una menor proporción y no logra llegar la inhibición total de las levaduras.

En este punto también es importante tener en cuenta que al realizar el recuento en cámara de Neubauer, no se evidenciaron células muertas sino una disminución progresiva de las mismas hasta llegar a una ausencia total, lo cual fue confirmado en los recuentos en placa realizados en agar SB.

Para establecer la CMM apropiada para el control de las levaduras contaminantes, fue necesario realizar un ensayo posterior, en donde se incrementó la concentración de los antimicrobianos y únicamente se emplearon los ácidos sórbico y benzoico al ser estos mas

efectivos en el control de las levaduras del proceso ya que estos en su forma disociada presentan mejor actividad antimicrobiana a pHs bajos debido a que a pH mayor de 4.0 existe una proporción alta sin disociar (Grupo industrial Aisa. 2008) y esto hace que funcione óptimamente bajo las condiciones del proceso.

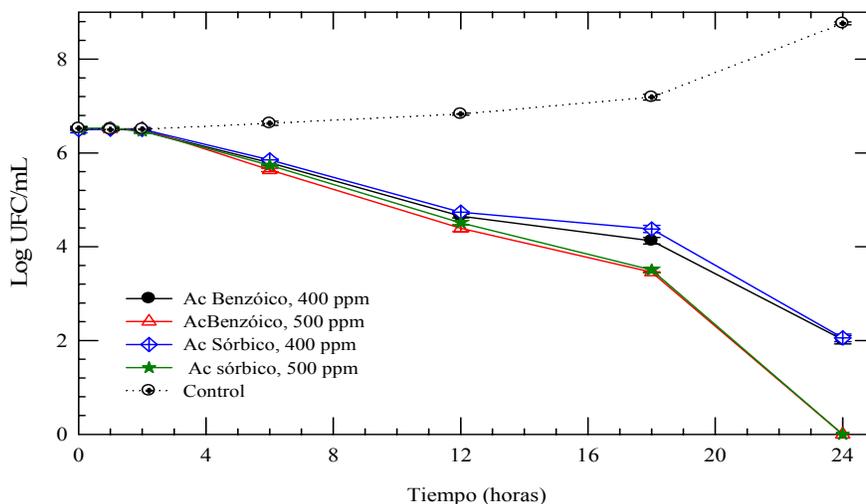


Figura 7. Ensayo 2 en columna. Grafica *C. glabrata*.

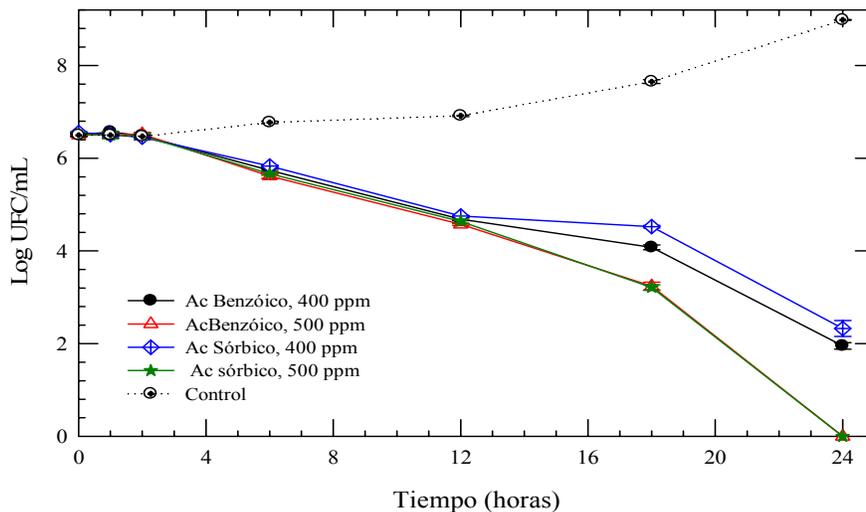


Figura 8. Ensayo 2 en columna. Grafica *S. cerevisiae*.

Como se observa en las figuras 7 y 8, y los anexos F y G; el efecto inhibitorio de los ácidos benzoico y sorbico fue evidente para las dos levaduras de prueba.

Un efecto inhibitorio significativo se evidenció a partir de la hora 2 de exposición hasta la hora 12, donde hubo un decrecimiento poblacional de 2 unidades logarítmicas y posteriormente de la hora 12 a la hora 24, donde se presentó un decrecimiento similar para los dos ácidos de prueba a 400 ppm; sin embargo a 500 ppm se evidenció un efecto más significativo, ya que de la hora 12 a la 24 la baja poblacional fue hasta de 4 unidades logarítmicas, mostrándose inhibición total a las 24 de exposición; motivo por el cual dicha concentración para los dos ácidos en mención fue seleccionada como la CMM.

Luego de comprobarse la eficacia de los ácidos benzoico y sórbico, se seleccionó el ácido sórbico como antimicrobiano para sustituir el metabisulfito de sodio en el proceso de producción de ácido cítrico, ya que el ácido benzoico pese a que es un conservante económico posee un cierto sabor astringente poco agradable que puede alterar el producto final y presenta toxicidad, relativamente baja pero mayor que la del ácido sórbico. (Milk science. 2007.)

## 6.6 Análisis estadístico

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se pudo determinar que para el ensayo 1 en columnas de burbujeo no hay diferencia estadísticamente representativa desde la hora 0 a la hora dos tanto para *C. glabrata* como para *S.cerevisiae* en relación con antimicrobianos de prueba a las concentraciones seleccionadas ( $F=2.84$ ;  $gl= 11$ ;  $P=1.19$ ); posteriores análisis utilizando la prueba de Tukey permitieron confirmar que el efecto antimicrobiano obtenido por las sales empleadas en el estudio es mucho menor al ejercido por los ácidos evaluados y que su efecto es similar al obtenido por el metabisulfito de sodio (Ver anexo H).

De igual forma, el análisis estadístico realizado en los ensayos en columnas de burbujeo se confirmó que el ácido benzoico seguido del ácido sórbico a una concentración de 500 ppm son los que ejercen un mejor efecto antimicrobiano a través del tiempo (ver figura 12).

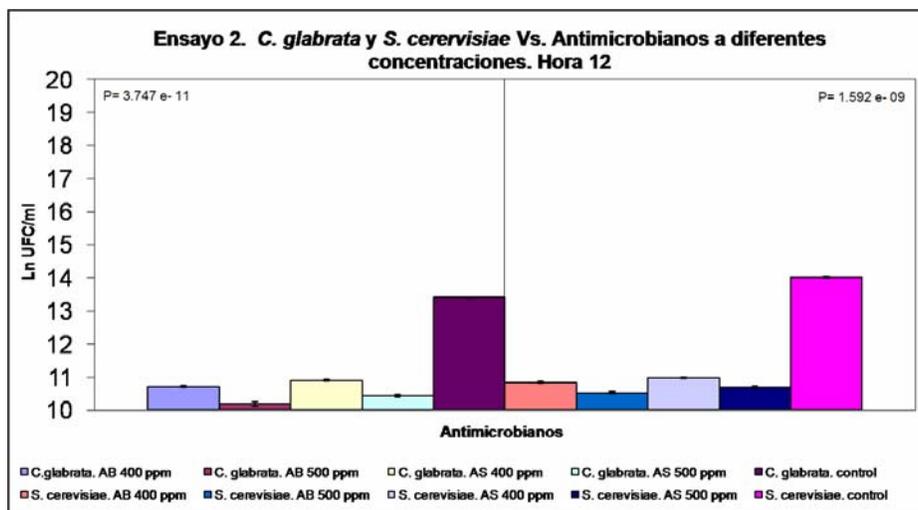


Figura 9. Ensayo 2 en columna. *C. glabrata* y *S. cerevisiae* Vs. Antimicrobianos a diferentes concentraciones. Hora 12 de exposición.

De igual forma, al realizar el análisis estadístico al segundo ensayo en columnas, se observó diferencia significativa tanto para la cepa de *C. glabrata* ( $F= 595.06$ ;  $gl= 3$ ;  $P= 3.079e-11$ ) como para *S. cerevisiae* ( $F= 135.75$ ;  $gl= 3$ ;  $P= 1.592e-09$ ) con relación a las concentraciones empleadas para el ácido benzoico y sórbico mediante la prueba de ANOVA, demostrándose así que la concentración de 500 ppm ejerce un mejor efecto inhibitorio; al mismo tiempo mediante el análisis de Tukey se pudo determinar que a dicha concentración el ácido benzoico seguido del ácido sórbico son los que tienen un mejor efecto inhibitorio, razón por la cual el uso de cualquiera de estos dos antimicrobianos para contrarrestar el crecimiento de levaduras contaminantes en la empresa, resulta ser efectivo (Ver anexo G).

Por otra parte, al comparar las dos levaduras de prueba, se determinó que pese a que la cepa obtenida a partir del tanque de sustrato, *S. cerevisiae* presenta un mayor crecimiento que la cepa de *C. glabrata*, el comportamiento de las dos levaduras contaminantes con relación a los antimicrobianos evaluados no es significativamente representativo.

## 7. CONCLUSIONES

- Se identificaron como *Cándida glabrata* y *S. cerevisiae* a las cepas contaminantes del proceso de producción de ácido cítrico.
- Se determinó la efectividad del sorbato de potasio, benzoato de sodio, ácido benzoico, y ácido sórbico mediante el método de CMI a través de la técnica de dilución en tubo dando como resultado 100 ppm para el benzoato de sodio y 200 ppm para los demás antimicrobianos evaluados.
- La determinación de la CMM usando la técnica de dilución en tubo mostró que las levaduras se inhibían completamente en una concentración igual o superior a 200 ppm para el benzoato de sodio y de 300 ppm para los demás antimicrobianos evaluados.
- Se determinó la CMM en columnas de burbujeo simulando condiciones de proceso, obteniendo como resultado una concentración de 500 ppm para los ácido sórbico y benzoico.
- Se eligió al ácido sórbico como sustituto del metabisulfito contra la contaminación de levaduras en la fermentación de ácido cítrico.

## 8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda emplear la técnica de dilución en tubo para realizar pruebas de CMI de sustancias antimicrobianas que presentan una solubilidad baja en agua.
- Al realizar ensayos de CMI a nivel de laboratorio se deben simular las condiciones del producto y el proceso (% acidez, biomasa microbiana de proceso) donde se va a utilizar el antimicrobiano para garantizar la obtención de una concentración aproximada a la real aplicable a escala industrial.
- Se recomienda realizar una evaluación de los posibles efectos a nivel físico-químico que puedan ejercer los antimicrobianos en el producto.
- Antes del uso del antimicrobiano en planta sería recomendable realizar un ensayo a escala piloto de modo que se asegure que las concentraciones empleadas a escala industrial son las adecuadas.
- Es importante evaluar la interacción del uso del antimicrobiano seleccionado con otro tipo de inhibidores físicos (aireación, temperatura) que puedan disminuir la concentración requerida del mismo para minimizar los costos de aplicación.

## 9. REFERENCIAS

- Alfaro, B. 2005. Evaluación de agentes antimicrobianos y desinfectantes sobre *Lactobacillus plantarum*. Microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogota. Colombia. 76 Pág.
- Andrews, J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(S1):5-16
- Al-Sa'ed, A.; Mihyar, G.; Yamani, M. 1997. Resistance of Yeast Flora of Labaneh to Potassium Sorbate and Sodium Benzoate. *Journal of Dairy Science* 80(10): 2304-2309.
- Austin, G. 1983. Shreve's Chemical Process Industries, 5th international ed. McGraw-Hill, New York, Sydney, 597-598.
- Barbosa, G.; Pothakamury, U.; Paulo, E. y Swason, B. 1999. Conservación no Térmica de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 280 Pág.
- Bartra, E. 2000. Genética de las levaduras. Estación de viticultura y Enología de la vilafranca del penedés. ACE. Revista de Enología. Edición N°3.
- Battey, A.; Duffy, S.; Schaffner, D. 2005. Modelo Predictivo de la descomposición por los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium spinulosum* de Bebidas Envasadas en Frío Listas para Beber. *Mundo alimentario*. Septiembre/octubre. 5-11.
- Calderón, M. 2007. Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Bogota. 144 Págs.
- Campos, C.; Gerschenson, L.; Gliemmo, M. 2006. Effect of several humectants and potassium sorbate on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* in model aqueous systems resembling low sugar products. *Journal of Food Engineering* 77:761–770
- Cantón, E.; Martín, E.; Espinel-Ingroff, A. 2001. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica., Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao. Capitulo 15
- Carvajal, F. y Rojas, C. 1993. Diseño de un proceso del filtrado de Citrato Tricálcico. Ingeniero Químico. Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Cali.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Ed. Universidad Nacional de Salta. 128 Pág.
- Castell-Perez, M.E.; Han, J.; Moreira, R.G. 2007. The influence of electron beam irradiation of antimicrobial-coated LDPE/polyamide films on antimicrobial activity and film properties. *LWT* 40:1545–1554

- Davidson, P.M. 1996. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds., En: Doyle MP; Beuchat LR, Monteville TJ; eds. Food Microbiology and Frontiers, Washington, DC: ASM Press: 1997:520-566
- Doran, P. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 468 págs.
- Fernández, C.; González, M. Illnait, M.; Martínez, G. 1998. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Rev Cubana Med Trop 50(1):48-53
- Fernández-Espinar, M.; Martorell, P.; Querol, A.; Stratford, M. Steels, H. 2006. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. International Journal of Food Microbiology 114:234–242
- García, M. 2004. Inhibición de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium digitatum* con mezclas energéticas de antimicrobianos naturales y sintéticos en sistemas modelo de puré de manzana mínimamente procesado. Licenciatura Ingeniería de alimentos. Departamento de ingeniería química y alimentos, Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla México.
- García, R. 2007. Las levaduras para la alimentación de los porcinos (*Saccharomyces cerevisiae*) <[www.engromix.com](http://www.engromix.com)>. [Fecha de consulta 25/11/07 15:11]
- Giese J. 1994. Antimicrobials: assuring food safety. Food technology. 48:102-110
- Gonzalez, A. Valenzuela, L. 2001. Microbios en Línea. *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de genética molecular, Instituto de fisiología celular. Universidad Nacional Autónoma de México.<<http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16>> [Fecha de consulta: 25/11/07 10:35]
- González, J; Calvo, A. 2005. Despertar de la era antibiótica. Revista Española Quimioterapia 18(3): 247-251.
- Gonzalez, P. 2008. Producción industrial de ácidos orgánicos. <<http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema22MI.html>> [Fecha de consulta: 07/06/08 09:45]
- Grupo industrial Aisa. 2008. Ácido benzoico y benzoato de sodio. □<http://www.geocities.com/grupoindustrialaisa/benzoato.html>□ [Fecha de consulta: 21/05/08 22:47]
- Guthrie, C. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. San Diego. 133 Págs.
- Halasz, A. & Lasztity, R. 2000. Use of yeast biomass in food production. CRC Press. 352 Pags.

- Heinzte, E.; Biwer, A.; Cooneg, C.2007. Development of sustainable bioprocesses modeling and assessment. Ed. Wiley. England. 294 Págs.
- Hidalgo, M. 2004. Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Revista médica del Hospital Nacional de Niños (Costa Rica) v.39(1):61-65.
- Howard B. J. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacterial that grow aerobically. 4<sup>th</sup> Ed. Approved Standard. pp: 645-650.
- Industria Alimenticia. 2006. El control de patógenos en los alimentos. Repaso a fondo de las últimas técnicas para combatir bacterias, hongos y otros microorganismos.  
<<http://www.industriaalimenticia.com/content.php?s=IA/2006/06&p=10>> [Fecha de consulta: 24/11/07 16:42]
- Jacques, K; Lyons, T & Kelsall, D. 1999. The alcohol textbook. 3rd Edition. Nottingham University press. 386 Pags .
- Kingsley, Jeffrey,;. Day, R.; Litz, L. 2001. Patentados  
□<http://patentados.com/invento/inyeccion-directa-de-oxigeno-en-reactores-de-columna-de-burbujas.html> □ [Fecha de consulta: 16/07/08 11:47]
- Kristiansen, B.; Matthey, M.; Linden, J. 1999. Citric Acid biotechnology. Theilor and Francis. Philadelphia. 187 pags.
- Lück, E. Jager, M. 2000. Conservación química de los alimentos. 2ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza España. 324 Págs.
- Marquéz, S. & Zabala. E. 2008. Genoma Sur. Introducción a la biología celular. Respiración. celular. <[www.genomasur.com/lecturas/Guia09.htm](http://www.genomasur.com/lecturas/Guia09.htm)> [Fecha de consulta: 21/02/08 21:23]
- Mathews, C; Van Holde, K & Ahern, K. 2002. Bioquímica. 3ª Edición. Ed. Addison Wesley. Madrid España. 1334 Págs.
- Merck. 2007. Antimicrobianos/conservantes.  
<<http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1393130/index.html>> [Fecha de consulta: 21/11/07 22:26]
- Microbiología. 2007. Antimicrobianos.  
<<http://www.microbiologia.com.ar/antimicrobianos/general.php>> [Fecha de consulta: 21/11/07 22:01]
- Milk science. 2007. Aditivos alimentarios. Conservantes.  
<<http://milksci.unizar.es/adit/conser.html>> [Fecha de consulta: 17/11/07 11:22]
- Moore, E. 1996. Fundament of the Fungy. Editorial Prenticehall. 325 págs
- Nelson & Cox. 2001. Lenhinger. Principles of biochemistry. Third edition. Worth edition. New york. 1790pp.

- Orberá, M. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. Rev Cubana Salud Pública. 30(3)
- Praphailong, W. and Fleet, G. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. Food Microbiology, 14:459–468
- Pulido, J. y Valderrama, J. 2007. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del formaldehído capaz de disminuir el crecimiento bacteriano de cepas obtenidas en piscinas de conservación cadavérica. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Bogota. 144 Págs.
- Quiminet.com. 2008. Ácido cítrico, obtención e historia. <[http://www.quiminet.com.mx/ar8/ar\\_9%251D%25BA%255B%25C3S%25B5%25D5.htm](http://www.quiminet.com.mx/ar8/ar_9%251D%25BA%255B%25C3S%25B5%25D5.htm)> [Fecha de consulta: 07/06/08 07:12]
- Rivero, A., Morongiu R., Lopes, C., Sangorrín, M. y Caballero, A. 2004. Carácter killer de levaduras patagónicas de origen enológico y su potencial aplicación en el control de contaminantes industriales y oportunistas XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Buenos Aires.
- Torres, J; Lopez, O.; Morera, Y. 2000. *Cándida glabrata*: Un patógeno emergente. Boletín de Control de Calidad SEIMC, vol 12(4):39-43.
- Wikipedia, enciclopedia libre. 2008. Ácido Cítrico. [http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido\\_c%C3%ADtrico](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_c%C3%ADtrico) [Fecha de consulta: 07/06/08 06:50],

## ANEXO A

### Ficha técnica de levadura seca activa Thermosacc dry

THERMOSACC® DRY is an active dry yeast for use in fuel ethanol and beverage alcohol fermentations. It contains a selected strain of *Saccharomyces cerevisiae* distillers' yeast in a highly concentrated and stable form. THERMOSACC DRY was selected for use in high-gravity fermentations at high temperatures and high sugar and alcohol concentrations. It works well at temperatures up to 98°F (37°C) and alcohol concentrations of more than 20% by volume (16% by weight). High concentrations and temperatures improve productivity and efficiency by producing more alcohol in less time. THERMOSACC DRY tolerates high levels of organic acids and is well suited to use in "zero discharge" fuel ethanol plants. THERMOSACC DRY produces a low level of fermentation by-products and is suitable for many types of beverage alcohol.

---

#### **SPECIFICATIONS**

THERMOSACC DRY contains a selected strain of *Saccharomyces cerevisiae* distillers' yeast.

#### **APPLICATIONS**

THERMOSACC DRY is intended for use in fuel ethanol and beverage alcohol fermentations. It ferments well at temperatures up to 98°F (37°C) and in a pH range of 3.5 to 6.0.

#### **DIRECTIONS FOR USE**

THERMOSACC DRY can be added directly to the fermenter at a rate of 1 to 2 pounds per 1,000 US gallons (10 to 25 grams per hectoliter). Lower levels can be used if there is a propagation or conditioning stage before the fermenter.

#### **STORAGE AND HANDLING**

THERMOSACC DRY should be stored in a cool, dry area away from heat from maximum stability. When stored under these conditions, the product is stable for 24 months from the date of manufacture.

#### **PACKAGING**

15- or 20-kilogram vacuum-sealed foil bag.

To the best of our knowledge, the information contained here is true and accurate. However, any recommendations or suggestions are made without any warranty or guarantee since conditions and methods of use are beyond our control. This information should not be considered as a recommendation that our products be used in violation of any patents.

Thermosacc® Dry  
ACTIVE DRY YEAST

## ANEXO B

### Composición de medios de cultivo

#### YEAST MALT AGAR (AGAR YM)

##### Levadura Maltosa agar

#### Composición g/L

Componente	Cantidad g/L
Dextrosa	3
Peptona	5
Extracto de malta	3
Extracto de levadura	3
Agar	20

pH final 6.2 +/- 0.2

#### AGAR SABORAUD (AGAR SB)

#### Composición g/L

Componente	Cantidad g/L
Peptona de carne	5
Peptona de caseína	5
Glucosa	40
Agar	15

pH final 5.6 +/- 0.2

## PAPA DEXTROSA AGAR (AGAR PDA)

### Composición g/L

Componente	Cantidad g/L
Peptona de papa	4
Glucosa	20
Agar	15

pH final 6.2 +/- 0.2

## ANEXO C

### Resultados de identificación de las dos levaduras contaminantes aisladas del proceso de producción de ácido cítrico.

<b>BIOINDUSTRIAL</b>  LABORATORIO DE ANALISIS INDUSTRIAL Y DE ALIMENTOS Su Laboratorio de Control de Calidad		 CERTIFICADO ISO 9001 CONFORME A LA ISO 9001							
<b>LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE ALIMENTOS, AGUAS Y PRODUCTOS FARMACEUTICOS</b>									
<b>IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS</b>									
<b>EMPRESA</b>	ATN. SRA. LIZETH LEON Tel: 444 4185 E. mail: <a href="mailto:lleon@sucromiles.com.co">lleon@sucromiles.com.co</a>	REF: 53							
<b>FECHA DE RECIBO</b>	JUNIO 09 – 2008								
<b>FECHA DE ANALISIS</b>	JUNIO 09 – 2008								
<b>FECHA DE RESULTADO</b>	JUNIO 14 – 2008								
<table border="1" style="width: 100%;"><thead><tr><th style="width: 50%;">MUESTRA</th><th style="width: 50%;">RESULTADO</th></tr></thead><tbody><tr><td>FERMENTADOR</td><td>Cándida glabrata</td></tr><tr><td>JARABE</td><td>Sacharomyces cerevisiae</td></tr></tbody></table>		MUESTRA	RESULTADO	FERMENTADOR	Cándida glabrata	JARABE	Sacharomyces cerevisiae		
MUESTRA	RESULTADO								
FERMENTADOR	Cándida glabrata								
JARABE	Sacharomyces cerevisiae								
<b>METODO DE IDENTIFICACION: MICROSCAN</b>									
<b>NOTA:</b> El resultado solo es aplicable a la muestra analizada. Este resultado no se permite reproducir sin la autorización de la Dirección del Laboratorio.									
 <b>MARIA TERESA ANUEL N.</b> Bacterióloga - Microbióloga Jefe de Laboratorio									
		CALLE 22N No. 2N-08 DIRECTO: 661 6980 PBX: 608 0049 Ext. 238 FAX: (2) 667 3300 <a href="http://www.angel.com.co">www.angel.com.co</a> e-mail: <a href="mailto:bioindustrial@angel.com.co">bioindustrial@angel.com.co</a> Cali - Colombia							

## ANEXO D

### Curvas de Crecimiento de levaduras

Curva de crecimiento de 8 horas para la levadura aislada de la etapa de fermentación.

HORA	Recuento en placa (UFC/ml)	Recuento en cámara Newbauer (levaduras/ml)	Porcentaje de Viabilidad %
0	$1,1 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	100%
1	$2,2 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	100%
2	$2,5 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	99%
3	$3,3 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	96%
4	$5 \times 10^5$	$9 \times 10^5$	100%
5	$7 \times 10^5$	$9,9 \times 10^5$	97%
6	<b><math>1,1 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,4 \times 10^6</math></b>	96%
7	$1,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	98%
8	$1,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	95%

Curva de crecimiento de 8 horas para la levadura aislada del tanque de sustrato.

HORA	Recuento en placa (UFC/ml)	Recuento en cámara Newbauer (levaduras/ml)	Porcentaje de Viabilidad %
0	<b><math>1,1 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^6</math></b>	99%
1	$1,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	97%
2	$2,9 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	98%
3	$3,7 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	97%
4	$4,9 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	97%
5	$6,2 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	96%
6	$1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	95%
7	$2,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	96%
8	$3,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	95%

Curva de crecimiento de 8 horas para la cepa control *S. cerevisiae*

HORA	Recuento en placa (UFC/ml)	Recuento en cámara Newbauer (levaduras/ml)	Porcentaje de Viabilidad %
0	$8,5 \times 10^5$	$8,8 \times 10^5$	100%
1	$9,3 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$	100%
2	<b><math>1,3 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,5 \times 10^6</math></b>	99%
3	$2,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	97%
4	$2,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	97%
5	$3,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	93%
6	$5,1 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	99%
7	$5,9 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	95%
8	$6,2 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$	92%

## ANEXO E

### FICHA TÉCNICA: BENZOATO DE SODIO

#### Ficha de Datos de Seguridad Según Reglamento (CE) 1907/2006

<p><b>1. Identificación de la sustancia/preparado y de la sociedad o empresa</b></p> <p><b>1.1 Identificación de la sustancia o del preparado</b> Denominación: Sodio Benzoato</p> <p><b>1.2 Uso de la sustancia o preparado:</b> Para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.</p> <p><b>1.3 Identificación de la sociedad o empresa:</b> PANREAC QUIMICA, S.A.U. C/Garraf, 2 Polígono Pla de la Bruguera E-08211 Castellar del Vallès (Barcelona) España Tel. (+34) 937 489 400 e-mail: product.safety@panreac.com Urgencias: Número único de teléfono para llamadas de urgencia: 112 (UE) Tel.:(+34) 937 489 499</p>
<p><b>2. Identificación de los peligros</b> Sustancia no peligrosa según Reglamento (CE) 1907/2006.</p>
<p><b>3. Composición/Información de los componentes</b> Denominación: Sodio Benzoato Fórmula: <math>C_6H_5COONa</math> M.=144,10 CAS [532-32-1] Número CE (EINECS): 208-534-8</p>
<p><b>4. Primeros auxilios</b></p> <p><b>4.1 Indicaciones generales:</b> En caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vómito.</p> <p><b>4.2 Inhalación:</b> Ir al aire fresco.</p> <p><b>4.3 Contacto con la piel:</b> Lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropas contaminadas.</p> <p><b>4.4 Ojos:</b> Lavar con agua abundante manteniendo los párpados abiertos.</p> <p><b>4.5 Ingestión:</b> Beber agua abundante. Provocar el vómito. Pedir atención médica.</p>
<p><b>5. Medidas de lucha contra incendio</b></p>

<p><b>5.1 Medios de extinción adecuados:</b> Agua. Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Espuma. Polvo seco.</p> <p><b>5.2 Medios de extinción que NO deben utilizarse:</b> -----</p> <p><b>5.3 Riesgos especiales:</b> Riesgo de explosión del polvo. Evitar la formación de cargas electrostáticas.</p> <p><b>5.4 Equipos de protección:</b> -----</p>
<p><b>6. Medidas a tomar en caso de vertido accidental</b></p> <p><b>6.1 Precauciones individuales:</b> -----</p> <p><b>6.2 Precauciones para la protección del medio ambiente:</b> -----</p> <p><b>6.3 Métodos de recogida/limpieza:</b> Recoger en seco y depositar en contenedores de residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos con agua abundante.</p>
<p><b>7. Manipulación y almacenamiento</b></p> <p><b>7.1 Manipulación:</b> Sin indicaciones particulares.</p> <p><b>7.2 Almacenamiento:</b> Recipientes bien cerrados.</p>
<p><b>8. Controles de exposición/protección personal</b></p> <p><b>8.1 Medidas técnicas de protección:</b> -----</p> <p><b>8.2 Control límite de exposición:</b> -----</p> <p><b>8.3 Protección respiratoria:</b> En caso de formarse polvo, usar equipo respiratorio adecuado.</p> <p><b>8.4 Protección de las manos:</b> Usar guantes apropiados</p> <p><b>8.5 Protección de los ojos:</b> -----</p> <p><b>8.6 Medidas de higiene particulares:</b> Quitarse las ropas contaminadas. Lavarse las manos antes de las pausas y al finalizar el trabajo.</p> <p><b>8.7 Controles de la exposición del medio ambiente:</b> Cumplir con la legislación local vigente sobre protección del medio ambiente.</p>

El proveedor de los medios de protección debe especificar el tipo de protección que debe usarse para la manipulación del producto, indicando el tipo de material y, cuando proceda, el tiempo de penetración de dicho material, en relación con la cantidad y la duración de la exposición.

## **9. Propiedades físicas y químicas**

Aspecto:

Sólido blanco.

Olor:

Inodoro.

pH 7-8 (10%)

Punto de inflamación : >100°C

Temperatura de auto ignición : >500°

Solubilidad: 660 g/l en agua a 20°C

## **10. Estabilidad y reactividad**

### **10.1 Condiciones que deben evitarse:**

-----

### **10.2 Materias que deben evitarse:**

-----

### **10.3 Productos de descomposición peligrosos:**

-----

### **10.4 Información complementaria:**

-----

## **11. Información toxicológica**

### **11.1 Toxicidad aguda:**

DL<sub>50</sub> oral rata: 4070 mg/kg

DL<sub>50</sub> oral ratón: 1600 mg/kg

DL<sub>50</sub> oral conejo: 2 g/kg

DL<sub>50</sub> oral perro: 2 g/kg

DTLo oral rata: 44 g/kg

### **11.2 Efectos peligrosos para la salud:**

Por ingestión de grandes cantidades: trastornos gastro-intestinales.

Observar las precauciones habituales en el manejo de productos químicos.

## **12. Información Ecológica**

### **12.1 Movilidad :**

-----

### **12.2 Ecotoxicidad :**

12.2.1 - Test EC<sub>50</sub> (mg/l) :

Bacterias CE0= 1000 mg/l

Peces (Leuciscus Idus) CL<sub>50</sub>= 460 mg/l

12.2.2 - Medio receptor :

Riesgo para el medio acuático = ----

Riesgo para el medio terrestre = ----

12.2.3 - Observaciones :

-----

**12.3 Degradabilidad :**

12.3.1 - Test : DBO<sub>5</sub> = -----

12.3.2 - Clasificación sobre degradación biótica :

DBO<sub>5</sub>/DQO Biodegradabilidad = -----

12.3.3 - Degradación abiótica según pH : -----

12.3.4 - Observaciones :

Producto fácilmente biodegradable.

**12.4 Acumulación :**

12.4.1 - Test :

-----

12.4.2 - Bioacumulación :

Riesgo = -----

12.4.3 - Observaciones :

Producto no bioacumulable.

**12.5 Otros posibles efectos sobre el medio natural :**

Manteniendo las condiciones adecuadas de manejo no cabe esperar problemas ecológicos.

**13. Consideraciones sobre la eliminación**

**13.1 Sustancia o preparado:**

En la Unión Europea no están establecidas pautas homogéneas para la eliminación de residuos químicos, los cuales tienen carácter de residuos especiales, quedando sujetos su tratamiento y eliminación a los reglamentos internos de cada país. Por tanto, en cada caso, procede contactar con la autoridad competente, o bien con los gestores legalmente autorizados para la eliminación de residuos.

2001/573/CE: Decisión del Consejo, de 23 de julio de 2001, por la que se modifica la Decisión 2000/532/CE de la Comisión en lo relativo a la lista de residuos.

Directiva 91/156/CEE del Consejo de 18 de marzo de 1991 por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los residuos.

En España: Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. Publicada en BOE 22/04/98.

ORDEN MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Publicada en BOE 19/02/02.

**13.2 Envases contaminados:**

Los envases y embalajes contaminados de sustancias o preparados peligrosos, tendrán el mismo tratamiento que los propios productos contenidos.

Directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 1994, relativa a los envases y residuos de envases.

En España: Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de

14.	<p>Envases. Publicada en BOE 25/04/97.  Real Decreto 782/1998, de 30 de abril, por el que se aprueba el  Reglamento para el desarrollo y ejecución de la Ley 11/1997, de 24 de  abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicado en BOE 01/05/98.</p>
<p><b>14. Información relativa al transporte</b></p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
<p><b>15. Información reglamentaria</b></p> <p style="text-align: center;">Etiquetado según REACH</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
<p><b>16. Otras informaciones</b></p> <p>Número y fecha de la revisión:0 15.04.08  Los datos consignados en la presente Ficha de Datos de Seguridad, están  basados en nuestros actuales conocimientos, teniendo como único objeto  informar sobre aspectos de seguridad y no garantizándose las propiedades  y características en ella indicadas.</p>	

## FICHA TÉCNICA: SORBATO DE POTASIO

### Ficha de Datos de Seguridad Según Reglamento (CE) 1907/2006

<p><b>1. Identificación de la sustancia/preparado y de la sociedad o empresa</b></p>	
<p><b>1.1 Identificación de la sustancia o del preparado</b></p>	<p>Denominación:  Potasio Sorbato</p>
<p><b>1.2 Uso de la sustancia o preparado:</b></p>	<p>Para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.</p>
<p><b>1.3 Identificación de la sociedad o empresa:</b></p>	<p>PANREAC QUIMICA, S.A.U.  C/Garraf, 2  Polígono Pla de la Bruguera  E-08211 Castellar del Vallès  (Barcelona) España  Tel. (+34) 937 489 400  e-mail: product.safety@panreac.com  Urgencias:  Número único de teléfono para llamadas de urgencia: 112 (UE)  Tel.:(+34) 937 489 499</p>
<p><b>2. Identificación de los peligros</b></p> <p style="text-align: center;">Sustancia no peligrosa según Reglamento (CE) 1907/2006.</p>	
<p><b>3. Composición/Información de los componentes</b></p>	

Denominación: Potasio Sorbato  
Fórmula:  $\text{CH}_3(\text{CHCH})_2\text{COOK}$  M.=150,22 CAS [24634-61-5]  
Número CE (EINECS): 246-376-1

#### 4. Primeros auxilios

##### 4.1 Indicaciones generales:

En caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vómito.

##### 4.2 Inhalación:

Ir al aire fresco.

##### 4.3 Contacto con la piel:

Lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropas contaminadas.

##### 4.4 Ojos:

Lavar con agua abundante manteniendo los párpados abiertos. En caso de irritación, pedir atención médica.

##### 4.5 Ingestión:

Beber agua abundante. Provocar el vómito. Pedir atención médica.

#### 5. Medidas de lucha contra incendio

##### 5.1 Medios de extinción adecuados:

Agua. Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Espuma. Polvo seco.

##### 5.2 Medios de extinción que NO deben utilizarse:

-----

##### 5.3 Riesgos especiales:

Combustible. Riesgo de explosión del polvo.

##### 5.4 Equipos de protección:

-----

#### 6. Medidas a tomar en caso de vertido accidental

##### 6.1 Precauciones individuales:

-----

##### 6.2 Precauciones para la protección del medio ambiente:

-----

##### 6.3 Métodos de recogida/limpieza:

Recoger en seco y depositar en contenedores de residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos con agua abundante.

#### 7. Manipulación y almacenamiento

##### 7.1 Manipulación:

Sin indicaciones particulares.

##### 7.2 Almacenamiento:

Recipientes bien cerrados. Ambiente seco. Temperatura ambiente. Protegido de la luz. No almacenar en recipientes metálicos.

#### 8. Controles de exposición/protección personal

**8.1 Medidas técnicas de protección:**

-----

**8.2 Control límite de exposición:**

-----

**8.3 Protección respiratoria:**

En caso de formarse polvo, usar equipo respiratorio adecuado.

**8.4 Protección de las manos:**

Usar guantes apropiados

**8.5 Protección de los ojos:**

Usar gafas apropiadas.

**8.6 Medidas de higiene particulares:**

Quitarse las ropas contaminadas. Lavarse las manos antes de las pausas y al finalizar el trabajo.

**8.7 Controles de la exposición del medio ambiente:**

Cumplir con la legislación local vigente sobre protección del medio ambiente.

El proveedor de los medios de protección debe especificar el tipo de protección que debe usarse para la manipulación del producto, indicando el tipo de material y, cuando proceda, el tiempo de penetración de dicho material, en relación con la cantidad y la duración de la exposición.

**9. Propiedades físicas y químicas**

Aspecto:

Sólido blanco.

Olor:

Inodoro.

pH X8,3(50 g/l

Punto de fusión : 270°C (de

Densidad (20/4): 1,36

Solubilidad: 582 g/l en agua a 20°C

**10. Estabilidad y reactividad**

**10.1 Condiciones que deben evitarse:**

Temperaturas elevadas.

**10.2 Materias que deben evitarse:**

Aluminio. Zinc. Sn.

**10.3 Productos de descomposición peligrosos:**

-----

**10.4 Información complementaria:**

-----

**11. Información toxicológica**

**11.1 Toxicidad aguda:**

DL<sub>50</sub> oral rata: 8000 mg/kg

**11.2 Efectos peligrosos para la salud:**

Por inhalación del polvo: tos. Irritaciones en vías respiratorias.

Por contacto ocular: irritaciones.

En contacto con la piel: irritaciones.

Observar las precauciones habituales en el manejo de productos químicos.

**12. Información Ecológica**

**12.1 Movilidad :**

-----

**12.2 Ecotoxicidad :**

12.2.1 - Test EC<sub>50</sub> (mg/l) :

-----

12.2.2 - Medio receptor :

Riesgo para el medio acuático = ----

Riesgo para el medio terrestre = ----

12.2.3 - Observaciones :

Efecto fungicida. Ecotóxico en medio acuático.

**12.3 Degradabilidad :**

12.3.1 - Test : DBO<sub>5</sub> = -----

12.3.2 - Clasificación sobre degradación biótica :

DBO<sub>5</sub>/DQO Biodegradabilidad = -----

12.3.3 - Degradación abiótica según pH : -----

12.3.4 - Observaciones :

Producto fácilmente biodegradable.

**12.4 Acumulación :**

12.4.1 - Test :

-----

12.4.2 - Bioacumulación :

Riesgo = -----

12.4.3 - Observaciones :

Producto no bioacumulable.

**12.5 Otros posibles efectos sobre el medio natural :**

Manteniendo las condiciones adecuadas de manejo no cabe esperar problemas ecológicos.

**13. Consideraciones sobre la eliminación**

**13.1 Sustancia o preparado:**

En la Unión Europea no están establecidas pautas homogéneas para la eliminación de residuos químicos, los cuales tienen carácter de residuos especiales, quedando sujetos su tratamiento y eliminación a los reglamentos internos de cada país. Por tanto, en cada caso, procede contactar con la autoridad competente, o bien con los gestores legalmente autorizados para la eliminación de residuos.

2001/573/CE: Decisión del Consejo, de 23 de julio de 2001, por la que se modifica la Decisión 2000/532/CE de la Comisión en lo relativo a la lista de residuos.

<p><b>13.2 Envases contaminados:</b></p>	<p>Directiva 91/156/CEE del Consejo de 18 de marzo de 1991 por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los residuos. En España: Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. Publicada en BOE 22/04/98.</p> <p>ORDEN MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Publicada en BOE 19/02/02.</p> <p>Los envases y embalajes contaminados de sustancias o preparados peligrosos, tendrán el mismo tratamiento que los propios productos contenidos.</p> <p>Directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 1994, relativa a los envases y residuos de envases. En España: Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicada en BOE 25/04/97.</p> <p>Real Decreto 782/1998, de 30 de abril, por el que se aprueba el Reglamento para el desarrollo y ejecución de la Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicado en BOE 01/05/98.</p>
<p><b>14. Información relativa al transporte</b></p> <p>-----</p>	
<p><b>15. Información reglamentaria</b></p> <p>Etiquetado según REACH</p> <p>-----</p>	
<p><b>16. Otras informaciones</b></p> <p>Número y fecha de la revisión: 0 15.04.08</p> <p>Los datos consignados en la presente Ficha de Datos de Seguridad, están basados en nuestros actuales conocimientos, teniendo como único objeto informar sobre aspectos de seguridad y no garantizándose las propiedades y características en ella indicadas.</p>	

## FICHA TÉCNICA: ÁCIDO BENZÓICO

### Ficha de Datos de Seguridad Según Reglamento (CE) 1907/2006

<p><b>1. Identificación de la sustancia/preparado y de la sociedad o empresa</b></p>	
<p><b>1.1 Identificación de la sustancia o del preparado</b></p>	<p>Denominación: Acido Benzoico</p>
<p><b>1.2 Uso de la sustancia o preparado:</b></p>	<p>Para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.</p>
<p><b>1.3 Identificación de la sociedad o empresa:</b></p>	<p>PANREAC QUIMICA, S.A.U.</p>

C/Garraf, 2  
Polígono Pla de la Bruguera  
E-08211 Castellar del Vallès  
(Barcelona) España  
Tel. (+34) 937 489 400  
e-mail: product.safety@panreac.com  
Urgencias:  
Número único de teléfono para llamadas de urgencia: 112 (UE)  
Tel.:(+34) 937 489 499

## 2. Identificación de los peligros

Nocivo por ingestión. Irrita los ojos.

## 3. Composición/Información de los componentes

Denominación: Acido Benzoico  
Fórmula:  $C_6H_5COOH$  M.=122,12 CAS [65-85-0]  
Número CE (EINECS): 200-618-2

## 4. Primeros auxilios

### 4.1 Indicaciones generales:

En caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vómito.

### 4.2 Inhalación:

Trasladar a la persona al aire libre.

### 4.3 Contacto con la piel:

Lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropas contaminadas.

### 4.4 Ojos:

Lavar con agua abundante manteniendo los párpados abiertos. Pedir atención médica.

### 4.5 Ingestión:

Beber agua abundante. Pedir atención médica.

## 5. Medidas de lucha contra incendio

### 5.1 Medios de extinción adecuados:

Agua. Dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Espuma. Polvo seco.

### 5.2 Medios de extinción que NO deben utilizarse:

-----

### 5.3 Riesgos especiales:

Combustible. En caso de incendio pueden formarse vapores tóxicos. Precipitar los vapores formados con agua. Refrigerar los recipientes con agua. No permitir el paso del agua de extinción a acuíferos superficiales o subterráneos.

### 5.4 Equipos de protección:

Ropa y calzado adecuados. Equipo de respiración autónomo.

## 6. Medidas a tomar en caso de vertido accidental

### 6.1 Precauciones individuales:

	<p>Evitar el contacto con la piel, los ojos y la ropa. No inhalar los vapores. Procurar una ventilación apropiada.</p> <p><b>6.2 Precauciones para la protección del medio ambiente:</b> No permitir el paso al sistema de desagües. Evitar la contaminación del suelo, aguas y desagües.</p> <p><b>6.3 Métodos de recogida/limpieza:</b> Recoger en seco y depositar en contenedores de residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos con agua abundante.</p>
<p><b>7. Manipulación y almacenamiento</b></p> <p><b>7.1 Manipulación:</b></p> <p><b>7.2 Almacenamiento:</b></p>	<p>Sin indicaciones particulares.</p> <p>Recipientes bien cerrados. Ambiente seco. Temperatura ambiente.</p>
<p><b>8. Controles de exposición/protección personal</b></p> <p><b>8.1 Medidas técnicas de protección:</b></p> <p><b>8.2 Control límite de exposición:</b></p> <p><b>8.3 Protección respiratoria:</b></p> <p><b>8.4 Protección de las manos:</b></p> <p><b>8.5 Protección de los ojos:</b></p> <p><b>8.6 Medidas de higiene particulares:</b></p> <p><b>8.7 Controles de la exposición del medio ambiente:</b></p>	<p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>Usar guantes apropiados( nitrilo)</p> <p>Usar gafas apropiadas.</p> <p>Quitarse las ropas contaminadas. Lavarse las manos antes de las pausas y al finalizar el trabajo.</p> <p>Cumplir con la legislación local vigente sobre protección del medio ambiente.</p> <p>El proveedor de los medios de protección debe especificar el tipo de protección que debe usarse para la manipulación del producto, indicando el tipo de material y, cuando proceda, el tiempo de penetración de dicho material, en relación con la cantidad y la duración de la exposición.</p>
<p><b>9. Propiedades físicas y químicas</b></p> <p>Aspecto:</p> <p>Olor:</p> <p>Inodoro.</p>	<p>Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento.</p>

pH X2,5-3,5  
Punto de ebullición :250°C  
Punto de fusión : 120°C  
Punto de inflamación : 121°C  
Temperatura de auto ignición : 570°C  
Solubilidad: 2,9 g/l en agua a 20°C

## 10. Estabilidad y reactividad

### 10.1 Condiciones que deben evitarse:

-----

### 10.2 Materias que deben evitarse:

Agentes oxidantes. Flúor. Oxígeno Bases.

### 10.3 Productos de descomposición peligrosos:

-----

### 10.4 Información complementaria:

-----

## 11. Información toxicológica

### 11.1 Toxicidad aguda:

CL<sub>50</sub> inh rata: > 12,2 mg/l/4h

DL<sub>50</sub> oral rata: 1700 mg/kg

DLLo oral hombre: 500 mg/kg

Test irritación ojo (conejos): Fuertemente irritante.

Test de sensibilización piel (conejos): levemente irritante.

### 11.2 Efectos peligrosos para la salud:

Por inhalación del polvo: irritaciones.

En contacto con la piel: irritaciones.

Por inhalación: irritaciones.

Por ingestión: Irritaciones en mucosas.

Por absorción de grandes cantidades: trastornos gastro-intestinales.

No se descartan otras características peligrosas. Observar las precauciones habituales en el manejo de productos químicos.

## 12. Información Ecológica

### 12.1 Movilidad :

-----

### 12.2 Ecotoxicidad :

12.2.1 - Test EC<sub>50</sub> (mg/l) :

Peces (L. Macrochirus): 44,6 mg/l/96h

Crustáceos (Daphnia Magna): 102 mg/l/24h

Algas: 10-100 mg/l/72h Bacterias (Photobacterium phosphoreum): 17 mg/l/30 min

12.2.2 - Medio receptor :

Riesgo para el medio acuático = ----

Riesgo para el medio terrestre = ----

12.2.3 - Observaciones :

Datos ecotóxicos no disponibles.

**12.3 Degradabilidad :**

12.3.1 - Test :  $DBO_5 = 1,65 \text{ g/g}$

DQO =  $1,95 \text{ g/g}$

ThOD =  $1,96 \text{ g/g}$

12.3.2 - Clasificación sobre degradación biótica :

$DBO_5/DQO$  Biodegradabilidad = Alta, más de 1/3

12.3.3 - Degradación abiótica según pH : -----

12.3.4 - Observaciones :

-----

**12.4 Acumulación :**

12.4.1 - Test :

-----

12.4.2 - Bioacumulación :

Riesgo = Bajo

12.4.3 - Observaciones :

-----

**12.5 Otros posibles efectos sobre el medio natural :**

Manteniendo las condiciones adecuadas de manejo no cabe esperar problemas ecológicos.

**13. Consideraciones sobre la eliminación**

**13.1 Sustancia o preparado:**

En la Unión Europea no están establecidas pautas homogéneas para la eliminación de residuos químicos, los cuales tienen carácter de residuos especiales, quedando sujetos su tratamiento y eliminación a los reglamentos internos de cada país. Por tanto, en cada caso, procede contactar con la autoridad competente, o bien con los gestores legalmente autorizados para la eliminación de residuos.

2001/573/CE: Decisión del Consejo, de 23 de julio de 2001, por la que se modifica la Decisión 2000/532/CE de la Comisión en lo relativo a la lista de residuos.

Directiva 91/156/CEE del Consejo de 18 de marzo de 1991 por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los residuos.

En España: Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. Publicada en BOE 22/04/98.

ORDEN MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Publicada en BOE 19/02/02.

**13.2 Envases contaminados:**

Los envases y embalajes contaminados de sustancias o preparados peligrosos, tendrán el mismo tratamiento que los propios productos contenidos.

Directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 1994, relativa a los envases y residuos de envases.

En España: Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicada en BOE 25/04/97.

Real Decreto 782/1998, de 30 de abril, por el que se aprueba el Reglamento para el desarrollo y ejecución de la Ley 11/1997, de 24 de

abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicado en BOE 01/05/98.

#### **14. Información relativa al transporte**

-----

#### **15. Información reglamentaria**

##### **15.1 Etiquetado según REACH**

Símbolos: S

Indicaciones de peligro: Nocivo

Frases R: 22-36 Nocivo por ingestión. Irrita los ojos.

Frases S: 24 Evítese el contacto con la piel.

#### **16. Otras informaciones**

Número y fecha de la revisión: 1 15.04.08

Respecto a la revisión anterior, se han producido cambios en los apartados: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15.

Los datos consignados en la presente Ficha de Datos de Seguridad, están basados en nuestros actuales conocimientos, teniendo como único objeto informar sobre aspectos de seguridad y no garantizándose las propiedades y características en ella indicadas.

## **FICHA TÉCNICA: ÁCIDO SÓRBICO**

### **Ficha de Datos de Seguridad Según Reglamento (CE) 1907/2006**

#### **1. Identificación de la sustancia/preparado y de la sociedad o empresa**

##### **1.1 Identificación de la sustancia o del preparado**

Denominación:

Acido Sòrbico

##### **1.2 Uso de la sustancia o preparado:**

Para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.

##### **1.3 Identificación de la sociedad o empresa:**

PANREAC QUIMICA, S.A.U.

C/Garraf, 2

Polígono Pla de la Bruguera

E-08211 Castellar del Vallès

(Barcelona) España

Tel. (+34) 937 489 400

e-mail: [product.safety@panreac.com](mailto:product.safety@panreac.com)

Urgencias:

Número único de teléfono para llamadas de urgencia: 112 (UE)

Tel.:(+34) 937 489 499

2.

<p><b>2. Identificación de los peligros</b></p> <p>Irrita los ojos y las vías respiratorias.</p>
<p><b>3. Composición/Información de los componentes</b></p> <p>Denominación: Acido Sórbico  Fórmula: C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> M.=112,13 CAS [110-44-1]  Número CE (EINECS): 203-768-7</p>
<p><b>4. Primeros auxilios</b></p> <p><b>4.1 Indicaciones generales:</b>  En caso de pérdida del conocimiento nunca dar a beber ni provocar el vómito.</p> <p><b>4.2 Inhalación:</b>  Ir al aire fresco.</p> <p><b>4.3 Contacto con la piel:</b>  Lavar abundantemente con agua. Quitarse las ropas contaminadas.</p> <p><b>4.4 Ojos:</b>  Lavar con agua abundante manteniendo los párpados abiertos. En caso de irritación, pedir atención médica.</p> <p><b>4.5 Ingestión:</b>  Beber agua abundante. Provocar el vómito. Pedir atención médica.</p>
<p><b>5. Medidas de lucha contra incendio</b></p> <p><b>5.1 Medios de extinción adecuados:</b>  Agua. Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Espuma. Polvo seco.</p> <p><b>5.2 Medios de extinción que NO deben utilizarse:</b>  -----</p> <p><b>5.3 Riesgos especiales:</b>  Combustible. Riesgo de explosión del polvo.</p> <p><b>5.4 Equipos de protección:</b>  -----</p>
<p><b>6. Medidas a tomar en caso de vertido accidental</b></p> <p><b>6.1 Precauciones individuales:</b>  No inhalar el polvo.</p> <p><b>6.2 Precauciones para la protección del medio ambiente:</b>  -----</p> <p><b>6.3 Métodos de recogida/limpieza:</b>  Recoger en seco y depositar en contenedores de residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos con agua abundante.</p> <p>7.</p>
<p><b>7. Manipulación y almacenamiento</b></p> <p><b>7.1 Manipulación:</b>  Sin indicaciones particulares.</p>

<p><b>7.2 Almacenamiento:</b> Recipientes bien cerrados. Ambiente seco. Temperatura ambiente.</p>
<p><b>8. Controles de exposición/protección personal</b></p> <p><b>8.1 Medidas técnicas de protección:</b> -----</p> <p><b>8.2 Control límite de exposición:</b> -----</p> <p><b>8.3 Protección respiratoria:</b> En caso de formarse polvo, usar equipo respiratorio adecuado.</p> <p><b>8.4 Protección de las manos:</b> Usar guantes apropiados</p> <p><b>8.5 Protección de los ojos:</b> Usar gafas apropiadas.</p> <p><b>8.6 Medidas de higiene particulares:</b> Quitarse las ropas contaminadas. Lavarse las manos antes de las pausas y al finalizar el trabajo.</p> <p><b>8.7 Controles de la exposición del medio ambiente:</b> Cumplir con la legislación local vigente sobre protección del medio ambiente.</p> <p style="text-align: center;">El proveedor de los medios de protección debe especificar el tipo de protección que debe usarse para la manipulación del producto, indicando el tipo de material y, cuando proceda, el tiempo de penetración de dicho material, en relación con la cantidad y la duración de la exposición.</p>
<p><b>9. Propiedades físicas y químicas</b></p> <p>Aspecto: Sólido blanco.</p> <p>Olor: Inodoro.</p> <p>pH X3(1,6 g/l) Punto de ebullición :228°C (de Punto de fusión : 134°C Punto de inflamación : 127°C Presión de vapor: (20°C)X0,013 m Densidad (20/4): 1,1 Solubilidad: 1,6 g/l en agua a 20°C</p>
<p><b>10. Estabilidad y reactividad</b></p> <p><b>10.1 Condiciones que deben evitarse:</b> -----</p> <p><b>10.2 Materias que deben evitarse:</b> -----</p> <p><b>10.3 Productos de descomposición peligrosos:</b></p>

-----  
**10.4 Información complementaria:**  
-----

**11. Información toxicológica**

**11.1 Toxicidad aguda:**

DL<sub>50</sub> oral rata: 7360 mg/kg

DL<sub>50</sub> oral ratón: 3200 mg/kg

DL<sub>50</sub> intraperitoneal ratón: 2820 mg/kg

Test de sensibilización piel (conejos): 1 mg/72h: muy

Test irritación piel (humano): 150 mg/1h: muy

**11.2 Efectos peligrosos para la salud:**

Por inhalación: tos. Irritaciones en vías respiratorias.

Por contacto ocular: irritaciones.

En contacto con la piel: irritaciones.

Observar las precauciones habituales en el manejo de productos químicos.

**12. Información Ecológica**

**12.1 Movilidad :**

-----

**12.2 Ecotoxicidad :**

12.2.1 - Test EC<sub>50</sub> (mg/l) :

-----

12.2.2 - Medio receptor :

Riesgo para el medio acuático = ----

Riesgo para el medio terrestre = ----

12.2.3 - Observaciones :

No ecotóxico.

**12.3 Degradabilidad :**

12.3.1 - Test : DBO<sub>5</sub> = -----

12.3.2 - Clasificación sobre degradación biótica :

DBO<sub>5</sub>/DQO Biodegradabilidad = -----

12.3.3 - Degradación abiótica según pH : -----

12.3.4 - Observaciones :

Producto fácilmente biodegradable.

**12.4 Acumulación :**

12.4.1 - Test :

-----

12.4.2 - Bioacumulación :

Riesgo = -----

12.4.3 - Observaciones :

Producto no bioacumulable.

**12.5 Otros posibles efectos sobre el medio natural :**

Manteniendo las condiciones adecuadas de manejo no cabe esperar problemas ecológicos.

**13. Consideraciones sobre la eliminación**

### **13.1 Sustancia o preparado:**

En la Unión Europea no están establecidas pautas homogéneas para la eliminación de residuos químicos, los cuales tienen carácter de residuos especiales, quedando sujetos su tratamiento y eliminación a los reglamentos internos de cada país. Por tanto, en cada caso, procede contactar con la autoridad competente, o bien con los gestores legalmente autorizados para la eliminación de residuos.

2001/573/CE: Decisión del Consejo, de 23 de julio de 2001, por la que se modifica la Decisión 2000/532/CE de la Comisión en lo relativo a la lista de residuos.

Directiva 91/156/CEE del Consejo de 18 de marzo de 1991 por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los residuos.

En España: Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. Publicada en BOE 22/04/98.

ORDEN MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos. Publicada en BOE 19/02/02.

### **13.2 Envases contaminados:**

Los envases y embalajes contaminados de sustancias o preparados peligrosos, tendrán el mismo tratamiento que los propios productos contenidos.

Directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 1994, relativa a los envases y residuos de envases.

En España: Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicada en BOE 25/04/97.

Real Decreto 782/1998, de 30 de abril, por el que se aprueba el Reglamento para el desarrollo y ejecución de la Ley 11/1997, de 24 de abril, de Envases y Residuos de Envases. Publicado en BOE 01/05/98.

## **14. Información relativa al transporte**

-----

## **15. Información reglamentaria**

Etiquetado según REACH

Símbolos: R

Indicaciones de peligro: Irritante

Frases R: 36/37 Irrita los ojos y las vías respiratorias.

Frases S: 22-24/25 No respirar el polvo. Evítese el contacto con los ojos y la piel.

## **16. Otras informaciones**

Número y fecha de la revisión: 0 15.04.08

Los datos consignados en la presente Ficha de Datos de Seguridad, están basados en nuestros actuales conocimientos, teniendo como único objeto informar sobre aspectos de seguridad y no garantizándose las propiedades y características en ella indicadas.

## ANEXO F

Resultados obtenidos en los ensayos en columnas de burbujeo. Levadura de fermentación

E N S A Y O 1	Tiempo (h)	Recuento en placa de levadura UFC/ml					
		Benzoato de sodio (300ppm)	Sorbato de Potasio (300ppm)	Ácido benzoico (300 ppm)	Ácido sórbico (300 ppm)	Metabisulfito de sodio (300ppm)	Control negativo
	0	2,9E+06	3,1E+06	3,0E+06	3,1E+06	2,9E+06	3,0E+06
	1	3,0E+06	2,9E+06	3,2E+06	2,8E+06	3,0E+06	3,0E+06
	2	2,8E+06	3,0E+06	2,8E+06	3,2E+06	3,0E+06	3,3E+06
	6	3,7E+05	4,0E+05	2,0E+05	2,3E+05	2,3E+05	4,5E+06
	12	2,5E+05	2,7E+05	5,3E+04	5,7E+04	5,7E+04	7,0E+06
	18	6,5E+04	6,8E+04	2,4E+04	2,7E+04	2,3E+04	1,5E+07
	24	2,5E+04	2,9E+04	1,2E+03	1,3E+03	1,1E+03	5,5E+07
E N S A Y O 2	Tiempo (h)	Ácido sórbico (400 ppm)	Ácido sórbico (500 ppm)	Ácido benzoico (400 ppm)	Ácido benzoico (500 ppm)	Control negativo	
	0	3,2E+06	3,4E+06	3,3E+06	3,3E+06	3,4E+06	
	1	3,3E+06	3,5E+06	2,9E+06	3,6E+06	3,2E+06	
	2	3,2E+06	3,0E+06	3,0E+06	3,3E+06	3,2E+06	
	6	7,2E+05	5,5E+05	6,3E+05	4,4E+05	4,3E+06	
	12	5,5E+04	3,3E+04	4,5E+04	2,5E+04	6,8E+06	
	18	2,4E+04	3,2E+03	1,4E+04	2,8E+03	1,6E+07	
	24	1,2E+02	0,0E+00	1,1E+02	0,0E+00	5,8E+07	

E N S A Y O 1	Tiempo (h)	Recuento en Cámara Newbauer levaduras/ml					
		Benzoato de sodio (300ppm)	Sorbato de Potasio (300ppm)	Ácido benzoico (300 ppm)	Ácido sórbico (300 ppm)	Metabisulfito de sodio (300ppm)	Control negativo
	0	3,0E+06	3,0E+06	3,0E+06	3,0E+06	2,8E+06	3,1E+06
	1	3,0E+06	2,9E+06	3,3E+06	2,7E+06	3,1E+06	3,1E+06
	2	2,9E+06	3,2E+06	2,9E+06	3,2E+06	3,1E+06	3,3E+06
	6	3,7E+05	3,9E+05	1,8E+05	2,1E+05	2,3E+05	4,5E+06
	12	2,5E+05	2,8E+05	5,3E+04	5,2E+04	5,5E+04	7,5E+06
	18	6,0E+04	6,7E+04	2,4E+04	2,6E+04	2,2E+04	1,6E+07
	24	2,5E+04	3,0E+04	1,2E+03	1,3E+03	1,1E+03	5,1E+07

E N S A Y O 2	Tiempo (h)	Ácido sorbico (400 ppm)	Ácido sorbico (500 ppm)	Ácido benzoico (400 ppm)	Ácido benzoico (500 ppm)	Control negativo
	0	3,0E+06	2,9E+06	3,0E+06	3,0E+06	3,1E+06
	1	3,2E+06	3,0E+06	3,3E+06	3,4E+06	3,0E+06
	2	3,0E+06	2,9E+06	3,0E+06	3,2E+06	3,1E+06
	6	7,3E+05	5,5E+05	6,5E+05	4,6E+05	4,6E+06
	12	5,4E+04	3,4E+04	4,5E+04	2,7E+04	6,7E+06
	18	2,7E+04	0,0E+00	1,6E+04	0,0E+00	1,4E+07
	24	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,2E+07

## ANEXO G

Resultados obtenidos en los ensayos en columnas de burbujeo. Levadura Sustrato

E N S A Y O 1	Tiempo (h)	Recuento en placa de levadura UFC/ml					
		Benzoato de sodio (300ppm)	Sorbato de Potasio (300ppm)	Ácido benzoico (300 ppm)	Ácido sórbico (300 ppm)	Metabisulfito de sodio (300ppm)	Control
	0	3,4E+06	3,6E+06	3,2E+06	3,8E+06	3,3E+06	3,7E+06
	1	3,3E+06	3,8E+06	3,4E+06	3,5E+06	3,4E+06	3,9E+06
	2	3,5E+06	3,6E+06	3,8E+06	3,5E+06	3,0E+06	4,5E+06
	6	4,8E+05	5,2E+05	3,1E+05	3,6E+05	3,0E+05	5,6E+06
	12	3,7E+05	3,7E+05	1,6E+05	2,2E+05	2,2E+05	8,0E+06
	18	5,6E+04	5,7E+04	2,4E+04	2,6E+04	2,2E+04	1,6E+07
	24	1,7E+04	2,5E+04	1,3E+03	1,40E+03	1,1E+03	6,5E+07
E N S A Y O 2	Tiempo (h)	Ácido sórbico (400 ppm)	Ácido sórbico (500 ppm)	Ácido benzoico (400 ppm)	Ácido benzoico (500 ppm)	Control	
	0	3,6E+06	3,3E+06	3,2E+06	3,2E+06	3,2E+06	
	1	3,3E+06	3,2E+06	3,7E+06	3,3E+06	3,2E+06	
	2	2,9E+06	3,1E+06	3,1E+06	3,3E+06	3,0E+06	
	6	6,8E+05	4,7E+05	5,5E+05	4,2E+05	6,0E+06	
	12	5,7E+04	4,4E+04	4,9E+04	3,8E+04	1,2E+07	
	18	3,4E+04	1,7E+03	1,2E+04	1,8E+03	4,5E+07	
	24	2,2E+02	0,0E+00	9,0E+01	0,0E+00	9,8E+07	

E N S A Y O 1	Tiempo (h)	Recuento en Cámara Newbauer levaduras/ml					
		Benzoato de sodio (300ppm)	Sorbato de Potasio (300ppm)	Ácido benzoico (300 ppm)	Ácido sórbico (300 ppm)	Metabisulfito de sodio (300ppm)	Control negativo
	0	3,40E+06	3,80E+06	3,40E+06	3,80E+06	3,30E+06	3,70E+06
	1	3,20E+06	3,70E+06	3,50E+06	3,50E+06	3,30E+06	4,00E+06
	2	3,60E+06	3,60E+06	3,80E+06	3,50E+06	3,00E+06	4,40E+06
	6	4,80E+05	5,10E+05	3,00E+05	3,60E+05	3,10E+05	5,60E+06
	12	3,60E+05	3,70E+05	1,60E+05	2,10E+05	2,30E+05	1,00E+07
	18	5,40E+04	5,70E+04	2,40E+04	2,70E+04	2,20E+04	3,80E+07
	24	1,70E+04	2,50E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,70E+07

E N S A Y O 2	Tiempo (h)	Ácido sorbico (400 ppm)	Ácido sorbico (500 ppm)	Ácido benzoico (400 ppm)	Ácido benzoico (500 ppm)	Control negativo
	0	3,30E+06	3,00E+06	3,40E+06	3,20E+06	3,20E+06
	1	3,40E+06	3,10E+06	3,50E+06	3,40E+06	3,20E+06
	2	3,00E+06	3,20E+06	3,10E+06	3,40E+06	3,10E+06
	6	6,70E+05	4,80E+05	5,30E+05	4,10E+05	6,10E+06
	12	5,80E+04	4,40E+04	5,10E+04	3,80E+04	1,20E+07
	18	3,50E+04	0,00E+00	1,50E+04	0,00E+00	4,30E+07
	24	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,60E+07

## ANEXO H

Aspecto macroscópico de las tres levaduras evaluadas.

Fotografías 5, 6 y 7. Colonias características de *C. glabrata* en agar PDA, YM y SB.



Fotografía 5. Agar PDA



Fotografía 6. Agar YM



Fotografía 7. Agar SB

Fotografías 8, 9 y 10. Colonias características de *S. cerevisiae* en agar PDA, YM y SB.



Fotografía 8. Agar PDA



Fotografía 9. Agar YM



Fotografía 10. Agar SB

Fotografías 11, 12 y 13. Colonias características de *S. cerevisiae* (cepa control) en agar PDA, YM y SB.



Fotografía 11. Agar PDA



Fotografía 12. Agar YM



Fotografía 13. Agar SB

## ANEXO I

### Estadística de ensayos en columnas de burbujeo

#### Ensayo 1. *C. glabrata*

##### Hora 0

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	5	142.083	28.417	11.921	0.1422
RESIDUALES	18	267.500	14.861		

##### Hora 1

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	5	34.833	6.967	43.241	0.00926
RESIDUALES	18	29.000	1.611		

##### Hora 2

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	5	81.708	16.342	68.012	0.001005
RESIDUALES	18	43.250	2.403		

##### Hora 6

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	1323.00	330.75	165.38	3,27E-12
RESIDUALES	15	30.00	2.00		

##### Hora 12

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	2	32.667	16.333	80.548	0.009881
RESIDUALES	9	18.250	2.028		

Hora 18

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	8440.2	2110.1	1438.7	< 2,2E-16
RESIDUALES	15	22.0	1.5		

Ensayo 1. *S. cerevisiae*

Hora 0

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	5	98.833	19.76	67.132	0.001079
RESIDUALES	18	53.000	2.944		

Hora 1

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	5	165.000	33.000	12.638	2,29E-02
RESIDUALES	18	47.000	2.611		

Hora 2

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	5	427.71	85.54	49.272	7,06E-07
RESIDUALES	18	31.25	1.74		

Hora 6

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	874.70	218.67	69.568	0.002247
RESIDUALES	15	471.50	31.43		

Hora 12

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	1449.20	362.30	182.67	1,58E-09
RESIDUALES	15	29.75	1.98		

Hora 18

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	4756.3	1189.1	463.28	1,63E-12
RESIDUALES	15	38.5	2.6		

Ensayo 2. *C. glabrata*

Hora 0

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	11.200	2.800	11.748	0.3612
RESIDUALES	15	35.750	2.383		

Hora 1

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	89.70	22.43	0.9908	0.4424
RESIDUALES	15	339.50	22.63		

Hora 2

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	89.70	22.43	0.9908	0.4424
RESIDUALES	15	339.50	22.63		

Hora 6

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	3	1621.50	540.50	288.27	1,92E-08
RESIDUALES	12	22.50	1.88		

Hora 12

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	3	1785.19	595.06	257.32	3,75E-08
RESIDUALES	12	27.75	2.31		

Hora 18

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	1	220.500	220.500	115.04	3,88E-02
RESIDUALES	6	11.500	1.917		

Ensayo 2. *C. cerevisiae*

Hora 0

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	33.2	8.3	69.167	0.002308
RESIDUALES	15	18.0	1.2		

Hora 1

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	49.700	12.425	10.804	0.0002513
RESIDUALES	15	17.250	1.150		

Hora 2

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	4	35.00	8.75	3.125	0.05678
RESIDUALES	15	42.00	2.80		

Hora 6

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	3	1480.69	493.56	239.30	5.75e-11
RESIDUALES	12	24.75	2.06		

Hora 12

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	3	967.25	322.42	135.75	1,59E-06
RESIDUALES	12	28.50	2.37		

Hora 18

RECURSO DE VARIACIÓN	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de P
TRATAMIENTO	1	840.50	840.50	916.9	8,61E-05
RESIDUALES	6	5.50	0.92		