



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CONTROL MICROBIOLÓGICO A ALTA PRESION CON CO₂
APLICADO EN ALIMENTOS SEMI - SOLIDOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

SANDRA PAOLA SANCHEZ RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002/



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof.	EDUARDO BARZANA GARCIA
Vocal	Prof.	RAUL AGUILAR CABALLERO
Secretario	Profa.	MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE
1er. Suplente	Profa.	MARTHA GILES GOMEZ
2do. Suplente	Profa.	MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 324. Departamento de Biotecnología y Alimentos. Edif. E. Facultad de Química
UNAM.

Asesor : Dr. Eduardo Bárzana García



A handwritten signature in black ink, appearing to read "E. Barzana", written over a horizontal line.

Sustentante: Sandra Paola Sánchez Rodríguez



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Sandra Paola Sánchez Rodríguez", written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su amor, comprensión y sacrificios que me permitieron alcanzar este logro tan importante en mi vida.

A mis hermanas por su cariño y compañía que me han motivado para salir siempre adelante.

Al Dr. Eduardo Bárzana García por permitirme realizar este proyecto contando siempre con todo su apoyo.

A la Dra. Carmen Wachter Rodarte por su importante colaboración, asesoría y ayuda brindada durante la realización de este proyecto. .

A Sandra Pérez Munguía por todas sus aportaciones durante el desarrollo de este proyecto.

A toda mi familia abuelos, tíos, primos y sobrinos. De una manera muy especial en memoria de mi querido abuelo Apolonio y mi querido primo Omar quienes fueron y seguirán siendo muy importantes en mi vida.

A mis compañeros y amigos de la universidad Issis, Brenda, Esperanza, Enrique, Joel, Alejandro, Sara, Adriana, Argelia, Lázaro y Rodolfo. También a mis queridas amigas Jenny, Edith y Ana. Por compartir conmigo tantos momentos agradables durante esta etapa de mi vida.

A Dios por permitirme existir y brindarme todo lo que tengo y que me ha permitido alcanzar esta meta.

Al subprograma 127 por la beca otorgada para la realización de mi tesis.

Hago una mención especial de reconocimiento a la UNAM por tan valiosos programas y proyectos que permitieron desarrollarme como estudiante y lograr mi meta propuesta de ser profesionista.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	
Objetivo General	13
Objetivos Particulares	13
CAPÍTULO I	
I) GENERALIDADES	14
1.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA ALTA PRESIÓN	14
1.1.1. Desarrollo histórico de la alta presión	17
1.1.2. Modo de aplicación de la alta presión	20
1.1.3. Efecto de la alta presión sobre los microorganismos	22
1.1.4. Tipos de resistencia a la alta presión	23
1.1.5. Efecto de la actividad del agua en la inactivación	25
1.1.6. Efecto de la alta presión sobre las características sensoriales de los alimentos	26
1.2. APLICACIÓN DEL CO₂ COMO MEDIO PRESURIZANTE	27
1.2.1. Propiedades del CO ₂	28
1.2.2. Posible mecanismo de inactivación	29
1.2.3. Efecto de los constituyentes del medio	31
1.2.4. Aplicación del CO ₂ en condiciones supercríticas	31

CAPÍTULO II

II) MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	34
2.2. METODOLOGÍA	35
2.2.1. Conservación del microorganismo	35
2.2.2. Preparación del inóculo	35
2.2.3. Preparación e inoculación de las muestras	37
2.2.4. Aplicación de la alta presión con CO ₂	39
2.2.5. Determinación de la cuenta microbiana	41
2.2.6. Cuantificación de las células no dañadas	42
2.2.7. Determinación de la inactivación en diferentes partes de la muestra	43
2.2.8. Determinación del pH	44
2.2.9. Determinación del daño que se provoca a <i>Leuconostoc citreum</i>	44
2.2.10. Determinación del efecto del calcio en la inactivación	46

CAPÍTULO III

III) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
PRIMERA ETAPA	
3.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES INICIALES DE TRABAJO	49
3.1.1. Efecto de la presión sobre la inactivación	50
3.1.2. Efecto de la cuenta inicial de microorganismos	52
3.1.3. Uniformidad de la inactivación en las muestras de masa	54
3.1.4. Efecto del tipo de muestra y determinación de las células no dañadas	56
3.1.5. Uniformidad de la inactivación en las muestras de agar	60
3.1.6. Efecto del pH	62

SEGUNDA ETAPA	
3.2. DETERMINACIÓN DEL DAÑO PROVOCADO A <i>Leuconostoc citreum</i> al aplicar la alta presión con CO ₂	64
3.2.1. Masa de maíz nixtamalizada	65
3.2.1.1. Determinación de la cinética de inactivación	65
3.2.1.2. Determinación de sustancias liberadas	68
3.1.1.3. Observación en el microscopio	69
3.1.1.4. Determinación de crecimiento	70
3.1.1.5. Determinación de producción de acidez	72
3.2.2. AGAR SOLIDIFICADO	74
3.2.2.1. Determinación de la cinética de inactivación	74
3.2.2.2. Determinación de sustancias liberadas	76
3.2.2.3. Observación en el microscopio	77
3.2.2.4. Determinación de crecimiento y producción de acidez	77
TERCERA ETAPA	
3.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL CALCIO EN LA INACTIVACIÓN <i>Leuconostoc citreum</i> AL APLICAR LA ALTA PRESIÓN CON CO ₂	80
IV) CONCLUSIONES	83
V) REFERENCIAS	86
VI) ANEXOS	92

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Aplicación de la alta presión hidrostática en diferentes productos alimenticios	19
Tabla 2 Efecto de la alta presión en características fisiológicas de los microorganismos	22
Tabla 3 Daño provocado por la alta presión según el tipo de microorganismo	23
Tabla 4 Propiedades físicas del dióxido de carbono	28
Tabla 5 Composición química de la tortilla de maíz	47
Tabla 6 Análisis típico del agar	48
Tabla 7 Concentraciones de calcio estudiadas	48
Tabla 8 Distribución de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de masa	54
Tabla 9 Distribución de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de agar	60
Tabla 10 Cambios de pH al aplicar la alta presión con CO ₂	63
Tabla 11 Determinación de sustancias liberadas en las muestras de masa	68
Tabla 12 Determinación de sustancias liberadas en las muestras de agar	76
Tabla 13 Influencia del calcio en la inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> al aplicar la alta presión con CO ₂	81

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Sistema de presurización discontinuo	20
FIGURA 2 Efecto de la actividad del agua	26
FIGURA 3 Diferentes productos presurizados	27
FIGURA 4 CO ₂ en condiciones supercríticas	32
FIGURA 5 Extractor HP 7680 T	39
FIGURA 6 Cartuchos de extracción	40
FIGURA 7 División de las muestras	43
FIGURA 8 Muestras de masa	50
FIGURA 9 Inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> en función de la presión	51
FIGURA 10 Inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> en función de la cuenta inicial	53
FIGURA 11 Uniformidad de la inactivación en las muestras de masa	55
FIGURA 12 Muestras de agar	57
FIGURA 13 Inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> en función del tipo de muestra	58
FIGURA 14 Uniformidad de la inactivación en las muestras de agar	61
FIGURA 15 Cinética de inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de masa	65
FIGURA 16 Crecimiento de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de masa	71
FIGURA 17 Producción de acidez de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de masa	73
FIGURA 18 Cinética de inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de agar	74
FIGURA 19 Crecimiento de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de agar	78
FIGURA 20 Producción de acidez de <i>Leuconostoc citreum</i> en las muestras de agar	79
FIGURA 21 Comparación de la inactivación de <i>Leuconostoc citreum</i> según el tipo de muestra	82

RESUMEN

Debido a que los tratamientos térmicos pueden causar daños a sustancias sensibles al calor como vitaminas, proteínas (desnaturalización), así como cambios al sabor, se están buscando nuevas alternativas a los procesos de esterilización como son: la utilización de campos de pulsos eléctricos altos, pulsos de luz intensa, campos de oscilación magnética, bioquímicos, tecnología de barreras, altas presiones hidrostáticas y altas presiones con CO₂, para producir alimentos de mayor calidad, así como para su mejor conservación. La aplicación de CO₂ bajo presión tiene actividad antimicrobiana y puede reducir el tiempo y temperatura requerida para la esterilización, pasteurización o escaldado y por lo tanto minimizar la degradación térmica de sustancias sensibles al calor.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la alta presión con CO₂ para la inactivación de *Leuconostoc citreum* en sistemas modelo semi-sólidos (masa de maíz nixtamalizada y agar solidificado). Para determinar la cinética de inactivación de *Leuconostoc citreum* se inocularon las muestras con el microorganismo utilizando diferentes cuentas iniciales que variaron en un rango de 10⁵ a 10¹¹ UFC/ g. La temperatura se mantuvo constante (45°C). Se aplicó una presión de 100, 189 y 316 bar durante diferentes tiempos en un rango de 5 a 60 minutos. La tasa de inactivación se incrementó al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento y no se observó diferencia entre las tres presiones estudiadas. En las muestras de masa la máxima reducción de microorganismos se obtuvo al aplicar el tratamiento durante 60 minutos obteniendo la inactivación completa del microorganismo. En las muestras de agar sólo se necesitaron 40 minutos de exposición al tratamiento. La cantidad de microorganismos supervivientes fue expresado como Log (N/No), donde N son los microorganismos viables después de aplicar el tratamiento y No son los microorganismos iniciales, antes de aplicar el tratamiento. También fueron estudiados los cambios fisiológicos de *Leuconostoc citreum* al exponerlo a la alta presión con CO₂. Se determinó su tolerancia a la sal, nivel de sustancias liberadas por absorción en UV a 260 y 280 nm, se realizó observación en el microscopio y la determinación del crecimiento y producción de acidez después de aplicar el tratamiento. Se pudo comprobar que el tratamiento provoca cambios en las características fisiológicas de *Leuconostoc citreum*, principalmente alteraciones en su actividad metabólica.

INTRODUCCIÓN

Los tratamientos térmicos son generalmente los métodos más explotados en la industria para estabilizar microbiológicamente los productos alimenticios, farmacéuticos y materiales poliméricos en aplicaciones biomédicas. Estos tratamientos son particularmente seguros ya que se logra la completa inactivación de los microorganismos y esporas debido principalmente al daño celular irreversible. Por otra parte las temperaturas que se emplean también presentan algunas desventajas, ya que pueden provocar la desnaturalización de proteínas, DNA, RNA, vitaminas, producción de compuestos tóxicos y características organolépticas indeseables.

Los tratamientos con alta presión están recibiendo una gran atención para la inactivación de microorganismos en productos alimenticios, como una alternativa a los tratamientos térmicos. La presión con modificaciones de temperatura se utiliza como un factor de estabilización. En este contexto la alta presión hidrostática es el tratamiento más estudiado como un proceso alternativo. Muchos trabajos de investigación han reportado resultados favorables en la inactivación de un amplio rango de microorganismos bajo diferentes condiciones operativas como son la temperatura, ciclos de presión y tiempos de exposición. Además un gran número de procesos utilizando la alta presión están siendo ya introducidos en el mercado.

El tratamiento con CO₂ supercrítico puede llegar a ser una alternativa relevante a la alta presión hidrostática en el campo de la inactivación microbiana en alimentos, ya que puede ser una técnica más favorecedora para la esterilización de materiales poliméricos térmica e hidrolíticamente sensibles. Ha sido demostrado que al aplicar altas presiones con CO₂, se asegura la preservación de los alimentos a presiones moderadas (menos de 200 bares), comparadas con las presiones empleadas en los métodos de la tradicional presión hidrostática (2000-7000 bares).

La eficiencia de este tratamiento está en función de la temperatura, pH, tiempo de exposición, % de humedad, composición del medio y tipo de microorganismos. De estas, el pH y el contenido de agua son los parámetros más importantes ya que pueden influir en la resistencia a la penetración del CO₂. Además el agua es requerida para la hidratación del CO₂ para formar ácido carbónico, el cual lleva a la acidificación del medio.

Este estudio pretende determinar la factibilidad técnica de utilizar al CO₂ como medio presurizante en comparación con el H₂O, debido a que los principales avances que se han obtenido sobre la tecnología de las altas presiones han sido al aplicar este tratamiento por medio de presurización de agua (tecnología APH).

Para estudiar el efecto de la alta presión con CO₂ se decidió aplicar el tratamiento sobre una bacteria láctica *Leuconostoc citreum* debido a que uno de los primeros objetivos de esta investigación era lograr la esterilización de muestras de pozol como un método alternativo al utilizado generalmente que es la irradiación. Actualmente se están realizando varias investigaciones acerca del pozol. Algunas de estas investigaciones requieren que este producto se encuentre en condiciones estériles para el posterior estudio de su microbiota de una manera más específica.

También son muy importantes las características físicas y biológicas que presentan las bacterias ácido lácticas. De manera específica las características que presenta *Leuconostoc citreum* podrían limitar el efecto de la alta presión con CO₂. Este microorganismo es gran positivo por lo que presenta una pared celular gruesa, en comparación con los Gram negativos. Esta característica la hace más resistente a la alta presión con CO₂. También es capaz de desarrollarse en un amplio rango de pH bajo (4.5-6.4). Es inmóvil, mesófilo, quimioheterótrofo.

Por todas las características antes mencionadas se especula que *Leuconostoc citreum* cuenta con la capacidad de resistir elevadas concentraciones de CO₂ y tener una mayor resistencia a la alta presión, además de poder tolerar una disminución del pH. Por lo que si se logra su completa inactivación, este tratamiento podría ser también efectivo para bacterias más sensibles tales como las Gram negativas, bacterias sensibles a cambios de pH y bacterias anaerobias.

También es importante recalcar que la mayoría de las investigaciones realizadas sobre la aplicación de las altas presiones con CO₂ se han llevado a cabo en medios líquidos, por lo que es conveniente llevar a cabo estudios en medios sólidos o semi-sólidos para conocer la capacidad del tratamiento y así poder ampliar su uso. El estudio se enfocó principalmente en lograr la inactivación de *Leuconostoc citreum* en sistemas modelo semi-sólidos (masa de maíz y agar solidificado) mediante la aplicación de altas presiones con CO₂, como una alternativa a los métodos tradicionales de conservación de alimentos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la cinética de inactivación de *Leuconostoc citreum* por altas presiones con CO₂, así como establecer las condiciones óptimas de operación con énfasis en la conservación de alimentos semi-sólidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la efectividad de la alta presión con CO₂ para lograr la inactivación de *Leuconostoc citreum* en medios semi-sólidos.
- Determinar el efecto de los siguientes parámetros en la inactivación de *Leuconostoc citreum*
 - Efecto de la presión
 - Efecto de la cuenta inicial
 - Efecto del pH
 - Efecto del tipo de muestra
 - Uniformidad en la inactivación
- Determinar el daño provocado a *Leuconostoc citreum* al aplicar la alta presión con CO₂.
- Comparar la efectividad del tratamiento aplicado en medios semi-sólidos con respecto a los estudios realizados en medios líquidos.

CAPÍTULO I

I) GENERALIDADES

1.1. PRINCIPIOS GENERALES DE LA ALTA PRESIÓN

Las técnicas tradicionales de conservación de los alimentos se basan en limitar o prevenir el crecimiento microbiano utilizando factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos, tales como la temperatura, la actividad de agua, el potencial redox, el pH, la ausencia de oxígeno, adición de conservadores, etc.

En la última década las investigaciones sobre la utilización de nuevas tecnologías complementarias o alternativas a los procesos térmicos tradicionales, en el proceso de alimentos, se han visto incrementadas en respuesta a la creciente demanda de los consumidores por disponer de productos de aspecto “fresco y natural”. La conservación de los alimentos mediante métodos no térmicos nace del concepto de que no sólo es importante su vida útil sino también lo es su calidad. Por lo tanto lo que se busca es que el consumidor se vea beneficiado con la calidad de los productos, en aspectos nutricionales y sensoriales, a precios razonables y que sean seguros desde todo punto de vista, según Barbosa-Cánovas (1998).

La presurización es una técnica de conservación muy reciente en el campo alimentario, que ha sido empleada industrialmente desde 1990. Esta tecnología destaca sobre los procesos térmicos (Knorr, 1993), pues estos últimos causan inevitablemente una pérdida de nutrientes y sabores.

Entre los tratamientos alternativos (no térmicos) usados para la conservación de los alimentos se encuentran los pulsos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, pulsos luminosos de alta intensidad, ultrasonidos, bioconservación y presurización, considerándose esta última como la técnica más viable desde el punto de vista comercial y algunos investigadores afirman que de todos estos tratamientos sólo se ha demostrado la efectividad de la alta presión en la inactivación de esporas y de enzimas (Mellar *et al*, 2000). Debido a que la alta presión ofrece varias ventajas:

- El tratamiento evita la deformación de los alimentos, ya que la presión se transmite uniforme e instantáneamente, es decir no hay gradientes (cumple la denominada regla isostática). A diferencia de lo que ocurre con los procesos térmicos, la alta presión es independiente del volumen y de la forma de la muestra, con lo que se reduce el tiempo requerido para procesar grandes cantidades de productos (Cheftel, 1995; Pothakamury *et al*. 1995).
- No produce deterioro de nutrientes termolábiles como por ejemplo vitaminas (no destruye vitamina C en jugos y néctares, frente a los métodos tradicionales de pasteurización (Kimura *et al*., 1994)), ni altera otros compuestos de bajo peso molecular, fundamentalmente aquellos responsables del aroma y sabor.
- No se altera el sabor natural, ni la coloración del alimento, pues las altas presiones no favorecen las reacciones de Maillard o de oscurecimiento no enzimático (Hayshi, 1989; Tamoaka *et al*, 1991 y Gross, 1994) .
- No produce residuos indeseables en consonancia con las políticas medio ambientales de la actualidad.
- No precisa de la incorporación de aditivos al alimento.
- Mejora ó induce la generación de propiedades funcionales en los alimentos.

-
- Es poco intensiva en el consumo de energía; por ejemplo, para calentar 1 litro de agua a 30 °C se necesita la misma energía que para presurizar a 400 MPa ese mismo volumen de agua.

Con respecto a las desventajas se pueden mencionar las siguientes (Téllez *et al.*, 2001):

- El alto costo del equipo. Sin embargo este inconveniente es cada vez menos importante ya que continuamente se desarrollan equipos cada vez más baratos. Además, existe un ahorro de energía en la operación debido al bajo consumo energético de esta técnica.
- La desconfianza del consumidor por comprar un producto “presurizado” por ser algo novedoso y desconocido. A pesar de ello, en Japón, USA y algunos países europeos los productos presurizados se consumen cada vez más.

Las altas presiones, por todas sus ventajas y características cuentan con aplicaciones de muy diversa índole en la industria alimentaria, la mayoría de ellas orientadas a la conservación de los alimentos. En algunos trabajos (Ledward *et al.*, 1995; Cheftel *et al.*, 1995) se describen de forma más o menos extensa y justificada todas esas aplicaciones para distintos grupos de alimentos. Entre las que figuran:

- Pasteurización y esterilización de los alimentos sin modificar el valor nutritivo ni las propiedades organolépticas.
- Inactivación/ activación de enzimas para retardar ó acelerar procesos de maduración, fermentación u otro tipo de transformaciones enzimáticas deseables en los alimentos.
- Modificación de la estructura debido a cambios en la configuración proteica: ablandamiento de textura en carnes y pescados, decoloración de hemoglobina en sangre de animales, inactivación de ciertas toxinas.

-
- Cambios en las transiciones de fase (congelación a temperaturas bajo cero evitando la formación de cristales de hielo, disminución del punto de fusión de lípidos, gelatinización a bajas temperaturas).
 - Extracción de compuestos alimentarios (pectinas, pigmentos e incluso agua).
 - Agregación de sólidos o polvos alimentarios para elaborarlos en forma de barras, cubos, tabletas.
 - Impide el oscurecimiento no enzimático en determinados alimentos, pues no favorece las reacciones de Maillard y además evita la oxidación lipídica en ciertos productos.

1.1.1. DESARROLLO HISTÓRICO DE LA TECNOLOGÍA DE LA ALTA PRESIÓN

La primera aplicación de las altas presiones en un alimento fue investigada por Hite (1899), que intentó esterilizar leche mediante presurización. Este trabajo fue el primero que demostró la reducción de la población microbiana mediante la aplicación de altas presiones. Este investigador y sus colaboradores también estudiaron los efectos de las altas presiones en frutas y hortalizas (Hite *et al.*, 1914). Pero ya años atrás Cailletet (1880,1891) y Amagat (1893) hacen las primeras investigaciones sobre el diseño de equipos de alta presión y también desarrollan métodos para la medición de valores de altas presiones (Téllez *et al.* 2001).

A comienzos del siglo XX resurge el interés por la investigación de las altas presiones, debido sobre todo a sus aplicaciones potenciales en la industria. Es cuando aparecen los trabajos del investigador que más contribuyó en este campo: Bridgman (1940,1958,1964), laureado con el premio Nobel de Física. Sus trabajos se centran sobre todo en analizar las propiedades de los materiales una vez sometidos a altas presiones, así

como en desarrollar procedimientos de aplicación de altas presiones y en diseñar nuevos equipos de generación de alta presión (Téllez *et al* 2001).

Otros autores dignos de mención en este campo son Poulter (1951) y McFarland (1973). Sus trabajos se centraron en el diseño de los cilindros, vasijas o cámaras donde se presurizan las muestras. La cámara que tiene forma cilíndrica, es el elemento más importante de todo el equipo de presurización y también la pieza más cara; es de acero y su espesor depende de la presión máxima de operación, del diámetro y del número de ciclos de trabajo previstos. Posteriormente, Zander (1980) investigó sobre el diseño de equipos probando nuevos materiales.

No es hasta la década de los 80's cuando realmente se empieza a investigar de forma exhaustiva las relaciones entre la alta presión y los alimentos. Las investigaciones sobre matrices alimentarias comenzaron en EU en 1982 (Universidad de Delaware) (Hoover *et al*, 1989 y 1993). En 1986 se iniciaron líneas similares de investigación en la Universidad de Kyoto, Japón (Hayashi, 1989a), lo que trae como resultado la creación de la Sociedad Japonesa de Alta Presión y el lanzamiento al mercado de los primeros alimentos presurizados. Japón es el país pionero en cuanto a la producción y comercialización de alimentos presurizados. Se trataba de alimentos procesados de tipo ácido, como jugos y derivados de frutas (Ledward *et al.*, 1995). El primer tipo de productos alimenticios presurizados fueron mermeladas de fresa, frambuesa, kiwi y manzana y se lanzaron al mercado por la compañía japonesa Meidi-Ya Food Co. Se pusieron a la venta al público en abril de 1990 (Askar, 1998). Hoy en día se comercializan muchos más productos en Japón (Cheftel, 1998) y en menor medida en EU y en Europa. En 1995 jugo de naranja comenzó a ser comercializado en Francia. En 1995 fue introducido en el mercado de EU guacamole presurizado y en España rebanadas de jamón presurizadas. En esta nueva tecnología se utiliza H₂O como medio presurizante, denominándose “alta presión hidrostática”. Las presiones aplicadas oscilan entre los 100 y 1000 Mpa. En la tabla 1 se exponen las mejoras que experimentan distintos tipos de alimentos tras la aplicación de la alta presión hidrostática. Algunos de ellos están siendo ya comercializados.

Tabla 1. Aplicaciones de la alta presión hidrostática en diferentes productos alimenticios

Producto alimentario	Condiciones del tratamiento	Función de la Alta Presión	Referencia
Maíz	500 MPa, 5 min.	Destrucción de la estructura cristalina del almidón	Hibi et al., 1993
Sorgo	500 MPa, 5 min.	Mejora en la calidad de la malta de sorgo	Dewar et al., 1994
Zanahoria	400 MPa, -20°C	Mejora en la textura y estructura histológica	Fichigami et al., 1997
Carne cruda de vaca	100-150 MPa, 30-40 min., 20°C	Acelera la maduración, mejora la vida útil y provoca ablandamiento	Cheftel, 1995
Salchichas y Pasteles de pescado	400 MPa	Gelatinización, disminución de la carga bacteriana	Cheftel, 1995
Mermeladas, yogur, salsas, gelatinas de frutas, geles	400 MPa, 10-30 min, 20°C	Pasteurización, facilita la penetración de azúcar y la formación de geles	Cheftel, 1995
Jugo de toronja	120-400 MPa, 2-20 min., 20°C	Reducción del sabor amargo	Cheftel, 1995
Jugo de mandarina	300-400 MPa, 2-3 min., 20°C	Mejora el aroma	Cheftel, 1995
Jugo de guayaba	400-600 MPa, 10 min	Aumenta la viscosidad de forma más suave que la pasteurización	Yen y Lin, 1998
Lechuga y tomate	300 MPa, 10 min., 20°C	Reduce en 1 log la población microbiana	Arroyo et al., 1997

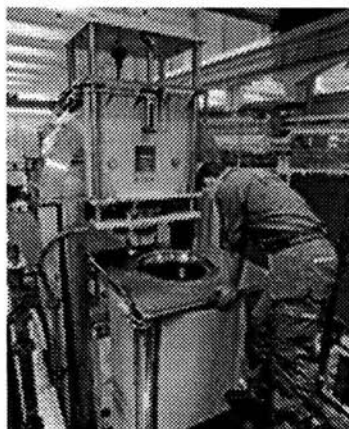
- El tratamiento se realizó a temperatura ambiente si no se especifica la temperatura. Ref. (Téllez *et al.*, 2001).

1.1.2. MODO DE APLICACIÓN DE LA ALTA PRESIÓN

Una breve descripción de cómo se lleva a cabo el proceso de presurización, es la siguiente:

El alimento se coloca en un recipiente de plástico estéril, se sella y se introduce en la cámara de presurización para su procesamiento. Se recomienda que el material plástico sea una película de alcohol de polivinilo (PVOH) y películas copoliméricas de alcohol de

etileno y vinilo (VEO). No hay posibilidad de deformación del paquete porque la presión ejercida es uniforme (no hay gradientes). Mertens (1993) expone y discute aspectos relacionados con la aplicabilidad de distintos materiales de envasado en la tecnología de la alta presión. La cámara de presurización, donde se introduce el alimento en el material de envasado apropiado, se cierra y se llena con el medio transmisor de la presión, normalmente agua. La presión aplicada comprime el medio transmisor alrededor del alimento provocando una disminución del volumen que varía según la presión y la temperatura aplicadas. A temperatura ambiente es del orden de 4% a 100 MPa. (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). El hecho de que se comprima tan poco volumen hace que el proceso sea poco peligroso, siempre que se use agua como medio presurizante. El alimento es sometido a alta presión por un tiempo determinado, el cual depende del tipo de alimento y de la temperatura del proceso. Al finalizar el tiempo, la cámara se descomprime y se extrae el alimento tratado. Seguidamente, se coloca una nueva carga de alimento en la cámara de presurización y se inicia así otro ciclo. Este es un ejemplo típico de un sistema de presurización discontinuo. Aunque desde el punto de vista industrial sería más factible desarrollar un proceso continuo a unos costos razonables, por otro lado las dificultades técnicas de fabricar cilindros que soporten presiones muy elevadas ha limitado la tecnología de las altas presiones.



El producto a ser tratado es puesto en el contenedor donde se aplica la alta presión y se somete durante 1 a 30 minutos a severas presiones isostáticas. El agua es usada como fluido de presurización.

Figura 1. Sistema de presurización discontinuo

1.1.3. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS MICROORGANISMOS

El efecto de la alta presión sobre la viabilidad de los microorganismos es una combinación de varios mecanismos (Farr, 1990): i) Cambios en la morfología de la célula; ii) Desnaturalización de proteínas a presiones altas debido al desdoblamiento de las cadenas peptídicas; iii) Modificaciones que afectan a la permeabilidad de la membrana celular. El estudio de los efectos de la presión sobre organismos vivos se denomina barobiología.

La extensión del efecto de la alta presión sobre la inactivación microbiana depende de variables de tratamiento tales como presión, tiempo y temperatura de exposición, además de la composición del alimento y tipo de microorganismos involucrados (Sangronis *et al.*, 1997). La alta presión produce cambios de tipo morfológico en las células vegetativas: compresión del gas de las vacuolas (Walsby, 1972), alargamiento de las células y formación de filamentos (Zobell y Cobet, 1962; Zobell, 1970), separación de la membrana celular de la pared celular (Osumi *et al.*, 1992), contracción de la pared celular con la formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y de los orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula (Cheftel, 1995). También provoca modificaciones bioquímicas y genéticas al inactivar las enzimas involucradas en la replicación y transcripción de ADN (Smelt, 1998). Algunos de estos cambios, expuestos por distintos autores se reflejan en la tabla 2 (Hoover *et al.*, 1989; Smelt, 1998).

La inactivación de los microorganismos por la alta presión puede ser debida a un incremento en la permeabilidad de la membrana, la inhibición de las reacciones productoras de energía y la desnaturalización de las enzimas esenciales para el desarrollo y reproducción de la célula (Pothakamury *et al.*, 1995).

Varios sistemas enzimáticos de los microorganismos son inhibidos o inactivados por la presión. Este es el caso de varias hidrogenasas, carboxipeptidasas y la ATPasa localizada en la capa de los fosfolípidos, involucrada en el fenómeno del transporte activo a través de la

membrana. Cuando se aplica la presión, varios sitios dentro de la célula bacteriana pueden dañarse y por lo tanto la ATPasa de la membrana no puede realizar su función, ya sea por una desnaturalización directa o por la dislocalización de la membrana. El ATP ya no se hidroliza, y por lo tanto, ya no está disponible para llevar a cabo el transporte activo de protones, el pH celular se acidifica y la célula finalmente muere (Téllez *et al.*, 2001).

Tabla 2. Efecto de la alta presión en características fisiológicas de los microorganismos.

Microorganismo	Condiciones	Efecto observado	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	40 MPa	Aumenta de 5 a 100 veces la longitud celular	Zobell y Cobet, 1962
<i>Vibrio spp.</i>	40 MPa	Aumenta de 5 a 8 veces la longitud de los filamentos	Zobell, 1970
<i>Bacillus mycoides</i>	27 MPa	Células 2-3 veces más largas	Zobell, 1970
<i>Serratia marcescens</i>	60 MPa	Aumenta de 130-2000 veces la longitud de los filamentos	Zobell, 1970
<i>Pseudomonas</i>	300-450 MPa	Alargamiento de las células	Kriss <i>et al.</i> , 1969
<i>E. coli</i> , <i>Vibrio</i> y <i>Pseudomonas</i>	20-40 MPa	Inmovilización y pérdida de flagelos	Zobell y Cobet, 1962; Zobell, 1970
Microorganismos barodúricos	50-200 MPa	Sobreviven pero no crecen	Zobell, 1970
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150-400 MPa	Ausencia de daños mecánicos en la célula	Butz <i>et al.</i> , 1990
<i>Candida tropicalis</i>	200 MPa	Separación de la pared celular y disgregación de la capa intermedia entre pared y membrana	Osumi <i>et al.</i> , 1992
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 MPa	Alteraciones en mitocondrias, citoplasma y membrana nuclear	Shimada <i>et al.</i> , 1993

Ref. (Téllez *et al.*, 2001)

1.1.4. TIPOS DE RESISTENCIA A LA ALTA PRESIÓN

Se ha encontrado que el mayor grado de inactivación sobre los microorganismos se lleva a cabo en la etapa logarítmica de crecimiento. En general, los microorganismos Gram negativos son los más sensibles a las altas presiones; les siguen las levaduras y hongos, los Gram positivos y por último las esporas; los virus son muy resistentes a las altas presiones, aunque depende del tipo de virus (Smelt, 1998). La mayoría de los autores coinciden en que las esporas bacterianas son las formas de vida más resistentes a la presurización (Farkas y Hoover, 2000). Presiones de 400 a 600 MPa inactivan las células vegetativas, mientras que para inactivar las esporas se necesitan presiones mayores. Se ha comprobado que ciertas esporas pueden requerir hasta 1500 MPa para su inactivación (Smelt, 1998). En la tabla 3 se presenta el posible daño que puede provocar al tratamiento según el tipo de microorganismo.

Tabla 3. Daño provocado por la alta presión según el tipo microbiano

Grupo de microorganismo	Implicaciones a la salud	Daño provocado
LEVADURAS HONGOS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	No provocan riesgo a la salud	Inactivación ó prevención del crecimiento ó retraso del crecimiento
PATÓGENOS TOXIGENICOS <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium botulinum</i> Micotoxinas de hongos	Microorganismos no infecciosos, pero son capaces de formar toxinas en los alimentos.	Inactivación ó prevención del crecimiento
PATÓGENOS INFECCIOSOS <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i>	Microorganismos que provocan infección	Inactivación completa del microorganismo

Ref. (Esmelt, 1998).

Como se menciona anteriormente, se ha observado una disminución de la síntesis del ADN a altas presiones. Esto se relaciona con la inactivación de las enzimas implicadas en esa síntesis. La doble hélice del ADN permanece estable debido a que los puentes de hidrógeno no se alteran con las altas presiones. La desnaturalización de las proteínas puede

ser irreversible por encima de los 300 MPa. Pero la replicación y transcripción del ADN, así como la síntesis de las proteínas, son inhibidas a niveles mucho más bajos de presión.

La fluidez de la membrana celular parece tener gran importancia en la inactivación por la presión. Las células son más resistentes a la presión cuando sus membranas son más rígidas. Las reacciones en las que se forman puentes de hidrógeno se ven favorecidas por la alta presión hidrostática debido a que estos enlaces provocan una disminución en el volumen de las moléculas. En las proteínas, la presión actúa principalmente en los enlaces hidrofóbicos y electrostáticos de la molécula. También causa la desprotonación de los grupos cargados, la ruptura de los puentes iónicos y de los enlaces hidrofóbicos, resultando en cambios conformacionales y estructurales. Las transiciones estructurales están acompañadas de grandes cambios de hidratación. Los cambios de hidratación son la mayor fuente de la disminución del volumen relativo a la disociación y desdoblamiento de las proteínas. (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). La extensión de la desnaturalización mediante este tratamiento depende del carácter hidrofóbico o hidrofílico de la molécula. Los ácidos nucleicos en una célula son más barorresistentes que las moléculas proteicas. Las moléculas del ADN son más estables a altas presiones, mientras que temperaturas altas causan su desnaturalización por pérdida de estructura.

La alta presión hidrostática causa una disminución en el espacio molecular disponible o un aumento de la interacción entre partículas. Las reacciones no se ven modificadas por las altas presiones si no existe un cambio de volumen entre productos y reactivos o si ambos poseen cargas iguales (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

Las altas presiones modifican la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, lo cual significa que las enzimas son alteradas por la alta presión. Esta alteración es debida a la modificación de las estructuras intermoleculares y cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima. Es por lo tanto de esperarse que algunas enzimas se inactiven con las altas presiones, mientras que otras se activen, fenómeno que ha sido observado (Télez *et al.*, 2001). La alta presión hidrostática aumenta la velocidad de las reacciones que involucran una disminución del volumen y retarda aquellas donde el volumen aumenta

(Téllez *et al.*, 2001), es decir, su efecto se rige por el principio de Le Chatelier , según la siguiente ecuación:

$$\ln k_{\text{cinética}} = \ln k_0 - \Delta V^{\ddagger} \cdot P/RT$$

Donde k es la constante de la reacción y ΔV^{\ddagger} el volumen de activación (variación de volumen entre el complejo activado y los reactivos). Este principio se refiere a que cuando se perturba un sistema en equilibrio éste responde tendiendo a minimizar el efecto de la perturbación. Esto quiere decir que cuando se aplica presión a un sistema en equilibrio el sistema se ajustará para minimizar el aumento.

1.1.5. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN LA INACTIVACIÓN

Para una actividad del agua cercana o por debajo de 0.9, las células vivas entran en un estado latente en el cual la membrana celular es modificada y llega a ser más resistente a la presión (Knorr, 1994). Por lo tanto la inactivación de los microorganismos sometidos a presurización depende de la actividad del agua. Para la inactivación de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* se requirieron niveles de presiones más altas o combinaciones de presión y temperatura cuando se encontraban en alimentos ricos en azúcar (Knorr, 1994). La resistencia a la inactivación se incrementa con una disminución en la actividad de agua y puede ser atribuida a una reducción y supresión del desarrollo de la célula. Las soluciones salinas también favorecen la resistencia a la APH. Se ha encontrado que en productos alimentarios desecados o con bajo contenido de agua, como las especias, el tratamiento APH no es efectivo para fines de esterilización, Al menos se necesita un porcentaje de agua de al menos un 70% para lograr reducir algo la población microbiana en mezclas de especies que contienen 10^5 microorganismos por gramo (Kowalski *et al.*, 1992).

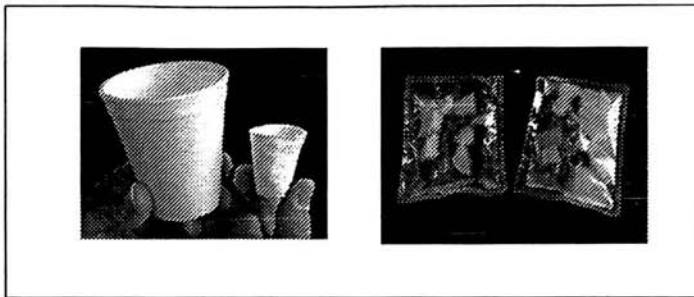


Figura 2. Efecto de la actividad del agua. Vaso de unicel sujeto a 266 Mpa y paquetes de fruta (con jugo) sujetos a 533 Mpa (Ver texto).

En la figura 2 se ilustra que el agua presente en los alimentos protege su estructura de daños físicos durante la compresión. Entre mayor sea el contenido de agua en los alimentos y menor la cantidad de aire, la presión hidrostática podría no dañar al alimento. En la figura 2 el vaso tiene un elevado contenido de aire por eso es dañado.

1.1.6. EFECTO DE LA ALTA PRESION SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS ALIMENTOS.

Aunque las características sensoriales de los alimentos en la mayoría de los casos mejoran o no sufren modificaciones con la alta presión, en otros sí se alteran y algunas veces de forma indeseable. El jugo de toronja tratado por esta nueva tecnología, a diferencia de los procesos térmicos convencionales, no posee el sabor amargo que le confiere el limoneno. Los jugos de otros cítricos, después del tratamiento adquieren un sabor fresco, sin pérdida de vitamina C y con una vida útil de 17 meses. Tanto colores, como sabores y olores, no se ven afectados por la alta presión (Sangronis *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de algunos tipos de frutas como las peras se produce un oscurecimiento rápido después del tratamiento debido a que se incrementa la actividad de la polifenoloxidasas (Asaka y

Hayashi, 1991). Otros autores (Kimura *et al.*, 1994) afirman que las mermeladas obtenidas por alta presión retienen el sabor y el color de la fruta fresca, a diferencia de las mermeladas procesadas por calentamiento. La influencia de este tratamiento en las características organolépticas de los alimentos depende del tipo de alimento y de las condiciones de presurización y no es posible generalizar. Se debe estudiar cada caso en particular antes de plantearse la comercialización de un producto alimenticio presurizado (Téllez *et al.*, 2001).

La reducida alteración del sabor de los alimentos puede deberse al hecho de que la alta presión no ataca los enlaces covalentes, los cuales son importantes en el sabor, pero los enlaces no covalentes como los puentes de hidrógeno típicos de la estructura terciaria de las proteínas sufren modificaciones importantes (Sangronis *et al.*, 1997).

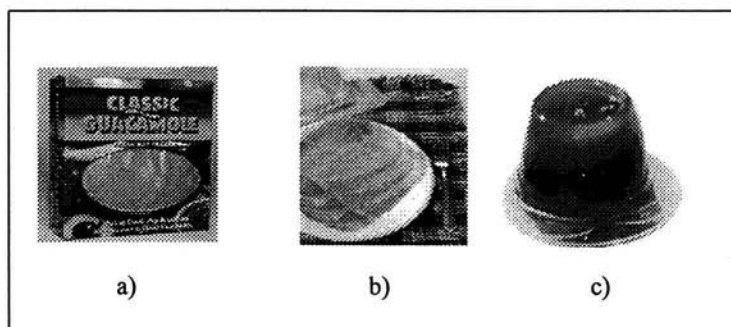


Figura 3. Diferentes productos presurizados. a) Guacamole, b) Rebanadas de jamón y c) Postre de frutas.

1.2. APLICACIÓN DEL CO₂ COMO MEDIO PRESURIZANTE

Las más recientes investigaciones acerca de las altas presiones se basan en determinar que tan factible es la aplicación de medios presurizantes diferentes al H₂O, tales como N₂ y CO₂. Actualmente han aumentado las investigaciones para determinar los efectos

dé la alta presión con CO₂ sobre la inactivación de microorganismos, encontrándose que se trata de una tecnología potencial no térmica para la preservación de alimentos (Hong *et al.*, 2000). Esta alternativa, sin embargo, no ha sido estudiada aún en forma sistemática.

1.2.1. PROPIEDADES DEL CO₂

Son muchas las características que hacen posible la utilización del CO₂ como medio presurizante, ya que es fisiológicamente seguro, no tóxico, barato, incoloro e inodoro y con ligero sabor ácido. La tabla 4 muestra las características físicas más importantes del CO₂.

Tabla 4. Propiedades físicas del dióxido de carbono (CO₂).

Peso molecular	44.01 g/mol
Peso específico	1.53
Temperatura y presión críticas	31.1°C y 72.8 atm.
Temperatura de ebullición (a 1 Kg/cm ²)	-78.5°C
Calor latente de vaporización	136.7 Kcal/Kg
Densidad de líquido (a 1 atm y -79.8°C)	1.562 Kg/m ³
Densidad de gas (a 1 atm)	2.814 Kg/m ³
Punto triple	-56.57°C, 5.185 bar

Ref. (A. Madrid *et. al.*; 1991)

Se ha reportado el uso de CO₂ bajo presiones en un intervalo de 10-100 atm para la inactivación de microorganismos y de ciertas enzimas (Haas *et al.*, 1989; Arreola *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1993,1994; Ishikawa *et al.*, 1995; Ballestra *et al.*, 1996; Hong, 1997). Sin embargo, no se encontraron trabajos referentes a la aplicación del tratamiento en medios semi-sólidos como los estudiados en este trabajo.

1.2.2 POSIBLE MECANISMO DE INACTIVACIÓN

La acción primaria de inactivación microbiana es probablemente iniciada por el disturbio ó daño del balance de los sistemas biológicos de las células (Lin *et al.*, 1993,1994). Esta metodología involucra la penetración del fluido dentro del microorganismo extrayendo los constituyentes de la célula. Al extraer los lípidos esenciales u otros componentes vitales de la célula o membranas celulares, las células son inactivadas (Lin *et al.*, 1992). Aunque reportes previos han demostrado la factibilidad del tratamiento con CO₂, el mecanismo de inactivación celular no ha sido explicado claramente (Hong *et al.*, 2000).

La ruptura de la pared celular durante el incremento de la presión o la extracción de los lípidos de la pared celular pueden ser una de las causas de la muerte celular. En la opinión de otros autores la inactivación se debe a la capacidad del CO₂ para difundirse fácilmente dentro de las células y alterar el pH en su interior. El factor clave es de otra forma atribuido a la inactivación de algunas enzimas por el decremento del pH y a la extracción de sustancias intracelular (como fosfolípidos y compuestos hidrofóbicos) e interferir con el transporte activo y pasivo a través de la membrana. También las descarboxilasas pueden ser inhibidas específicamente por un gran exceso de CO₂, rompiendo los cambios metabólicos. Otra posible causa de inactivación es la reacción del bicarbonato de la célula que podría relacionarse con el efecto bactericida del CO₂. El bicarbonato se convierte en carbonato que es capaz de precipitar al calcio y magnesio intracelular y por lo tanto producir cambios en los sistemas biológicos.

Resulta interesante notar que, independientemente del mecanismo, generalmente se han observado dos fases en las curvas de sobrevivencia de los microorganismos tratados con CO₂ bajo presión. A cualquier presión, la primera fase es caracterizada por índice de inactivación lento, el cual aumenta rápidamente en la segunda fase (Erkmen. 2000).

El CO₂ puede encontrar la penetración dentro de las células a una velocidad mucho más rápida que el oxígeno y que otros fluidos que no producen acidificación en solución.

Los parámetros que más influyen en la inactivación microbiana a través de la alta presión con CO₂ son: presión, acidificación, temperatura, tiempo de exposición y tipo de microorganismo. Estos factores no sólo afectan en la inactivación microbiana por las características de transferencia del CO₂, sino también actúa en la actividad biológica de las células microbianas. Otros factores que también pueden influir en la tasa de inactivación son: contenido de agua, pH, constituyentes del medio, estado del CO₂ (gas, líquido y supercrítico) y crecimiento celular; siendo el pH y el contenido de agua de la suspensión los parámetros más importantes, ya que pueden influir en la resistencia celular a la penetración del CO₂ (Ballestra *et al.*, 1996).

Es importante reconocer que la presión controla principalmente el índice de solubilización del CO₂ y su solubilidad en el medio de suspensión. Por consiguiente, a presiones elevadas aumenta la solubilización de CO₂ facilitando su contacto con las células y una vez que el CO₂ penetra dentro de las células y su concentración alcanza un nivel crítico ejerce un efecto letal. Debido a esto la inactivación microbiana por altas presiones con CO₂ es gobernada esencialmente por la penetración del CO₂ dentro de las células (Hong, 1997).

Van Eijs, (1989) reportó los efectos del CO₂ sobre *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Sus resultados demostraron que cuatro posibles mecanismos pueden ser responsables del daño celular debido a la alta presión con CO₂:

- 1) Extracción de compuestos esenciales
- 2) Estallido de la célula
- 3) Acidificación del medio
- 4) Toxicidad del CO₂

1.2.3. EFECTO DE LOS CONSTITUYENTES DEL MEDIO

Previos estudios realizados sobre la esterilización de alimentos con alta presión con CO₂ indicaron que el agua es esencial para lograr la inactivación de los microorganismos y que el CO₂ bajo presión es inocuo al aplicarse a sustancias secas (Taniguchi *et al.*, 1987). La razón por la que las células son más accesibles a un tratamiento con CO₂ es probablemente un resultado directo del hinchamiento de la pared y membrana celular en presencia de agua siendo así más permeables al CO₂ (Lin *et al.*, 1993). El agua también es requerida para la hidratación del CO₂ y formar ácido carbónico que puede modificar el pH de la suspensión (Hong y Pyun, 1999).

Particularmente el CO₂ tiene relativamente baja solubilidad en agua, siendo más soluble en lípidos, dependiendo de la presión y temperatura. Por lo que podría penetrar fácilmente a través de la membrana celular que consiste en una doble capa de fosfolípidos, cambiando su fluidez. Esta difusión a través de la membrana que también es favorecida por la presión podría llevar a cabo un rápido decremento del pH interno. A pH ácido algunas enzimas como las que participan en la glicólisis podrían ser inactivadas. Estas enzimas juegan un papel fundamental en la regulación de los procesos metabólicos como son el transporte de iones, aminoácidos y péptidos.

1.2.4. EL CO₂ EN CONDICIONES SUPERCRITICAS

Se ha considerado como más favorable la utilización del CO₂ en estado supercrítico, ya que además de presentar las características antes mencionadas tiene una presión y temperatura crítica relativamente bajas de 72.8 atm y 31.1°C. Los fluidos supercríticos tienen un alto poder como solvente cerca del punto crítico y este puede ser variado

fácilmente por encima de un amplio rango a través de leves cambios en temperatura y presión.

Los fluidos supercríticos exhiben una única combinación de propiedades: densidad típica de un líquido y alta compresibilidad, muy baja viscosidad y una alta difusividad; ambas propiedades típicas de los gases. Las dos primeras propiedades hacen que el poder solvente de los fluidos supercríticos sea más fácilmente controlable, mientras que la baja viscosidad y difusividad marcan un incremento en el fenómeno de transporte de masa y aumenta la velocidad de los procesos (Andrzej y Janusz, 1994).

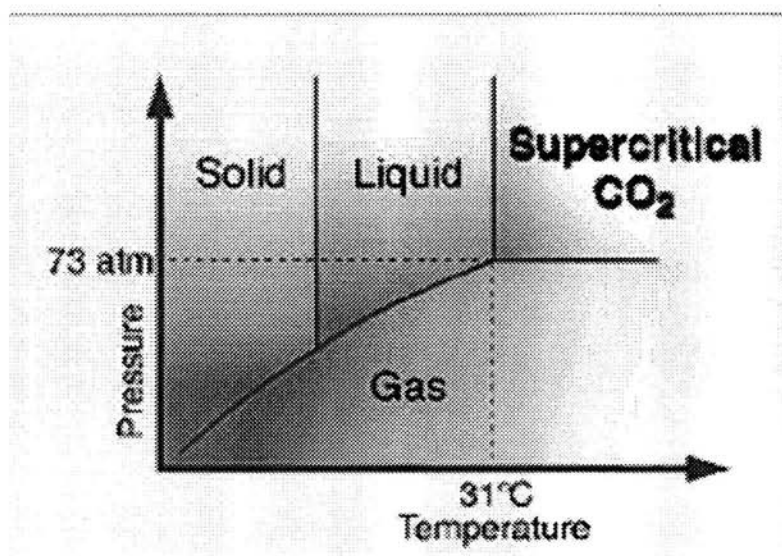


Figura 4 . CO₂ en condiciones supercríticas

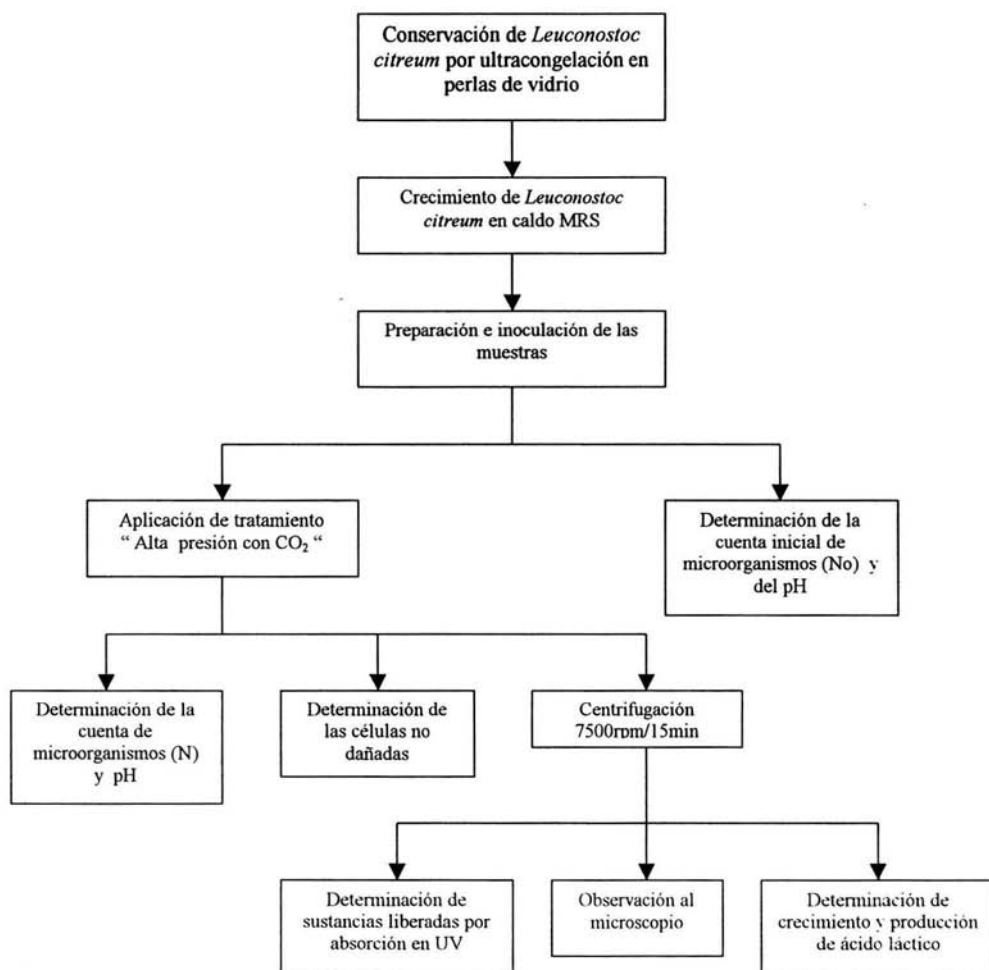
Se han realizado muy pocas investigaciones acerca del efecto antimicrobiano del CO₂ en condiciones supercríticas. El primer trabajo fue publicado por Kamihira et al., (1987) quienes reportaron el efecto de esterilización que presenta el CO₂ supercrítico en comparación con el CO₂ gaseoso y líquido. Lin *et al.*, (1991,1992) estudiaron la desintegración de células de *Sacharomyces cerevisiae* usando CO₂ en condiciones supercríticas y subcríticas, encontrando que el tratamiento no es muy efectivo para algunas células microbianas, incluyendo levaduras, que tienen la pared celular extremadamente gruesa y rígida. Se ha demostrado que el tratamiento con este fluido a 150 bar por 15 min. provoca la misma reducción microbiana que al aplicar la alta presión hidrostática a 3000 bar a la misma temperatura y tiempo (Esmelt, 1992).

Hasta ahora este método ha sido poco estudiado y no ha sido explotado a nivel industrial. Se requieren más investigaciones para determinar el mecanismo exacto de inactivación y así proporcionar nuevos métodos para mejorar la eficiencia del tratamiento y poder ampliar su aplicación en los alimentos.

CAPÍTULO II

II) MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1. CONSERVACIÓN DEL MICROORGANISMO

Se utilizó la cepa 42L, aislada previamente de muestras de pozol, conservada por ultracongelación (-70 °C).

Se inocularon 10 ml de caldo APT (DIFCO Lab Detroit, Michigan), contenidos en un tubo de centrifuga de 50 ml, con una perla de vidrio conservada a -70 °C en donde se encuentra presente el microorganismo. Se incubó por 24 horas a 30°C. Después de este tiempo el cultivo se centrifugó a 7500 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante. El paquete celular se lavó dos veces con 10 ml de H₂O destilada estéril (Se añadieron 10 ml de agua destilada estéril, se agitó y se centrifugó a 7500rpm durante 15 min y después se decantó el sobrenadante). El paquete celular ya lavado se resuspendió en 0.2ml de agua destilada estéril y se transfirió a viales con perlas de vidrio en glicerol (se utilizaron 20 perlas en cada tubo con 0.8 ml de caldo nutritivo con glicerol al 11%). Se agitaron los tubos vigorosamente y se retiró el líquido con una pipeta pasteur. Los tubos se almacenaron a -70°C.

2.2.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se utilizó el caldo MRS (Oxoid) para cultivar a *Leuconostoc citreum*. Las condiciones de incubación dependieron de la cuenta inicial de microorganismos requeridos para llevar a cabo la experimentación. La cuenta inicial de microorganismos varió en un rango de 10⁵ a 10¹¹ UFC/g. A continuación se presenta el procedimiento de preparación del inóculo para obtener las diferentes cuentas iniciales que se utilizaron:

CUENTA INICIAL EN UN RANGO DE 10^5 UFC/g.

Se inocularon 5 ml de caldo MRS (Oxoid), con 1 perla de vidrio. El caldo se incubó a 30°C por 22 horas y después se diluyó 100 veces (tomando 0.5 ml del cultivo y diluyendo en 4.5 ml de peptona al 0.1%, dos veces). De esta manera la concentración del cultivo inicial se encontró en un rango de 10^5 UFC/g.

CUENTA INICIAL EN UN RANGO DE 10^7 UFC/g

Se inocularon 5 ml de caldo MRS con una perla de vidrio. El caldo se incubó a 30°C por 22 h. Después de este tiempo de incubación la concentración del cultivo inicial se encontró en un intervalo de 2.7×10^7 a 1.1×10^8 UFC/g. Para ajustar la concentración inicial del inóculo, después de las 22 h de incubación se ajustó su absorbancia a 540 nm.

CUENTA INICIAL EN UN RANGO DE 10^9 UFC/g.

Se inocularon 5 ml de caldo MRS con 1 perla de vidrio y se incubó durante 22 h a 30°C . Después de la incubación el medio de cultivo se resuspendió en 45 ml de caldo MRS, contenidos en un tubo de centrifuga de 50 ml, dejándose incubar por 22 h a 30°C . Después de este tiempo de incubación el medio se centrifugó a 7500 rpm durante 15 min y se decantó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 5 ml de caldo MRS y el medio se agitó vigorosamente. La concentración de cultivo inicial se encontró en un rango de 1.8×10^9 a 5.6×10^9 UFC/g.

CUENTA INICIAL EN UN RANGO DE 10^{11} a 10^{12} UFC/g

Se inocularon 45 ml de caldo MRS con 9 perlas de vidrio y se incubó por 22 h a 30°C. Después de este tiempo de incubación los 45 ml de cultivo se reinocularon en 405 ml de caldo MRS contenidos en un tubo de centrifuga de 500 ml, dejándose incubar por 22h a 30 °C. El medio se centrifugó a 7500 rpm durante 15 min. y se decantó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 7.5 ml de peptona estéril al 0.1% y por último se homogeneizó el cultivo mediante agitación. La concentración del cultivo inicial se encontró en un rango de 10^{11} a 10^{12} UFC/g.

2.2.3. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LAS MUESTRAS

2.2.3.1. MUESTRAS DE MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADA

Se pesaron 25g de H₂O estéril y se le adicionaron 5 ml del cultivo previamente obtenido, dependiendo de la cuenta inicial que se haya requerido, se homogeneizó para la incorporación del medio de cultivo con el agua. Se agregaron 20g de harina de maíz nixtamalizada (marca Minsa, lote # 1153), y por último se homogenizó la mezcla para así obtener la masa. Se utilizaron muestras de 5g de masa. También se determinó su porcentaje de humedad y actividad de agua.

2.2.3.2. MUESTRAS DE AGAR

Se utilizaron muestras de agar para inmovilizar el microorganismo debido a las propiedades que presenta: El agar es un polímero sulfatado compuesto principalmente por D-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y ácido D-glucurónico. El agar es un buen agente solidificante porque una vez que se funde en agua hirviendo, puede enfriarse hasta una temperatura de 40 a 42°C sin solidificarse y no se funde de nuevo hasta que no se alcance una temperatura de 80 a 90°C. Las propiedades y estabilidad del gel dependen de la concentración de agar y de su peso molecular.

Se hicieron pruebas para determinar qué porcentaje de humedad se requería para que las muestras de agar fueran manejables (gel duro y que pudiera ser disgregado en el homogeneizador Stomacher). Se probaron diferentes porcentajes de bactoagar (DIFCO Lab., Detroit, USA): 2, 3, 5, 7, 10 y 12%. Se logró la formación del gel hasta un 7% de bactoagar, ya que al utilizar una concentración arriba del 10% ni siquiera se pudo obtener la completa hidratación del bactoagar. También se hicieron pruebas de homogeneización de estas muestras en el Stomacher, para verificar que se pudiera obtener el completo rompimiento del gel y así liberar al microorganismo y determinar posteriormente la cuenta microbiana.

Por medio de estas pruebas se decidió utilizar muestras con 7% de bactoagar. Para su elaboración se incorporaron 1.57g de bactoagar en 22.5 ml de H₂O destilada. posteriormente se esterilizó (121°C durante 15 min.) y después se dejó enfriar hasta una temperatura alrededor de 45°C. Se adicionaron 2.5ml del cultivo previamente obtenido. homogeneizando rápidamente mediante agitación para evitar su solidificación. Se tomaron muestras de 5 ml por medio de una jeringa de 10 ml y este volumen se transfirió rápidamente al cartucho cilíndrico de acero inoxidable donde se aplica la alta presión con CO₂. para de esta manera darle la forma a las muestras de agar.

2.2.4. APLICACIÓN DE LA ALTA PRESIÓN CON CO₂

La aplicación de la alta presión con CO₂ se llevó a cabo en el equipo Hewlett Packard Mod 7680 T (Figura 5), utilizado principalmente para extracción analítica.

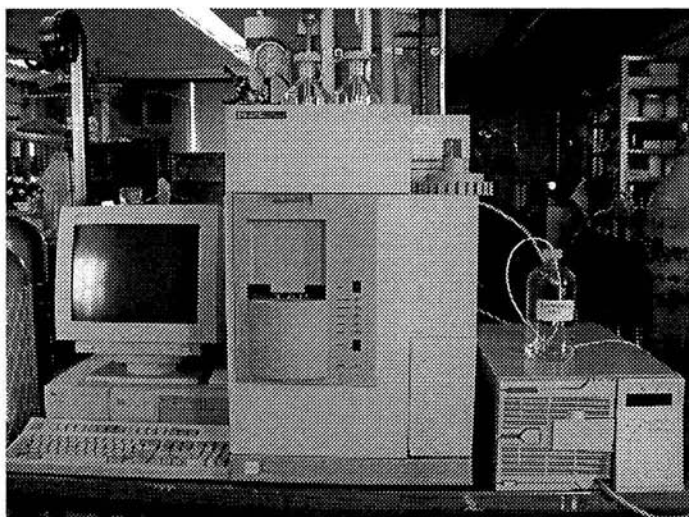


Figura 5. Extractor Hewlett Packard 7680 T

2.2.4.1. ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO

Especificaciones físicas: Tamaño 68 cm. X 43 cm x 53 cm; 83 cm x 46.3 cm x 52.8 cm con botellas de solventes de enjuague y charola del carrusel. Peso: 68 Kg. El extractor se encuentra acoplado a una computadora HP 486 que tiene un software especialmente diseñado para este equipo (Chemstation de HP).

Cartuchos de extracción (figura 6): Cartuchos de sello automático a fuerza constante de cerrado. 7 ml de capacidad con sellos *peek*, orientación vertical y tamaño de poro de 2.0 micras en los sellos. Tapones colocables a mano. Presión máxima 540 bar.

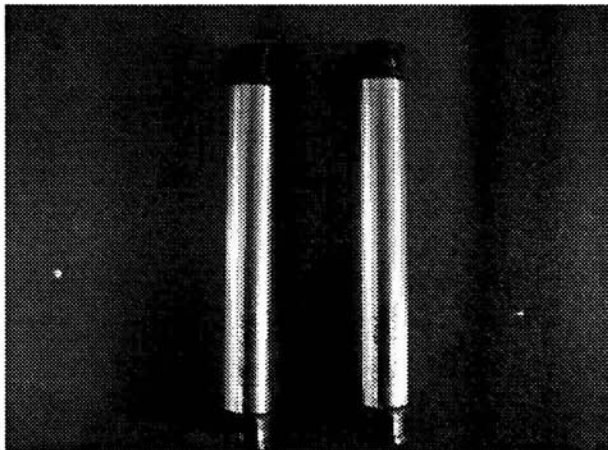


Figura 6. Cartuchos de extracción

2.2.4.2. APLICACIÓN DE LA ALTA PRESION EN EL EQUIPO

Los pasos para la aplicación del tratamiento son los siguientes:

1. Filtrar y desgasificar los solventes de enjuague. Los solventes deben ser de grado HPLC.
2. Purgar la bomba de solventes de enjuague.
3. Colocar la muestra en el cartucho. Taparlo, colocando un circulo de papel filtro en cada tapón para evitar el paso de partículas hacia la tubería.
4. Ajustar las condiciones de extracción en la computadora:

-
- Temperatura = 45°C
 - Flujo de CO₂ = 1ml/min
 - Presión = 100, 189 y 316 bar
 - Tiempo = 5 a 60 min.
5. Correr el método
 6. Purgar el disolvente para limpiar las tuberías.

2.2.5. DETERMINACIÓN DE LA CUENTA MICROBIANA ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.

2.2.5.1. CUENTA EN PLACA DE MICROORGANISMOS

Las muestras antes y después del tratamiento se colocaron en 45 ml de peptona al 0.1%, contenidos en un matraz de 250 ml. Posteriormente se pasaron a bolsas de stomacher y se homogenizaron en un stomacher 400 (Seward). La velocidad de homogenización varió dependiendo del tipo de muestra, para las muestras de masa se usó una velocidad normal durante 30 segundos y para las muestras de agar una velocidad alta durante 2 min. Se realizaron diluciones decimales en viales con 4.5 ml de peptona al 0.1%. Se inocularon 0.1 ml de cada dilución en cajas Petri con agar MRS, por duplicado. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se determinó la cuenta de microorganismos en cada una de las cajas que contuvieran entre 30 y 300 colonias. El diagrama de trabajo se presenta en el anexo 3.

2.2.5.2. DETERMINACION DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO SOBRE LOS MICROORGANISMOS

El efecto del tratamiento se evaluó como el logaritmo del cociente entre la proporción de células sobrevivientes después del tratamiento y la cuenta de células antes del tratamiento $[\log (N/N_0)]$. Considerando que la cinética de inactivación es exponencial y pudiera seguir el comportamiento de una reacción de primer orden, la cinética de inactivación se puede expresar así:

$$-d[N]/dt = k[N], \text{ integrando:}$$

$$\text{Log } [N/N_0] = -kt$$

Al graficar el $\text{Log } (N/N_0)$ en función del tiempo se obtiene una línea recta cuya pendiente es igual a la constante de inactivación.

2.2.6. CUANTIFICACIÓN DE LAS CELULAS NO DAÑADAS

La cuenta de microorganismos no dañados en las muestras tratadas y sin tratar se determinó en cajas de agar MRS con 5% de NaCl (MRSS). Este medio se utilizó para determinar las células que no fueron dañadas durante la aplicación de la alta presión, ya que las células que presentan algún tipo de daño son incapaces de formar colonias en medios que presenten algún tipo de restricción. en este caso se utilizó agar MRS con una alta concentración de sal.

2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA INACTIVACIÓN EN DIFERENTES PARTES DE LA MUFSTRA

Debido a que el CO₂ fluye por la parte superior e inferior del tubo de acero inoxidable al aplicar la alta presión. Se llevó a cabo la división de las muestras de masa y de agar después de aplicar la alta presión con CO₂ para determinar si la inactivación del microorganismo era uniforme en cualquier parte del cilindro. Para esto las muestras de 5 g se dividieron transversalmente en tres partes de un mismo tamaño y peso (1.66 g) como se muestra en la figura 7.

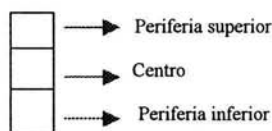


Figura 7. División de las muestras de 5 g de agar o de masa

Cada parte de la muestra se colocó en 18 ml de peptona al 0.1%, contenidos en matraces de 50 ml. Posteriormente se homogeneizaron en un “stomacher”, la velocidad de homogeneización dependió del tipo de muestra por lo que, para las muestras de masa se uso una velocidad normal durante 30 segundos y para las muestras de agar velocidad alta durante 2 min. Se realizaron diluciones decimales para posteriormente determinar la cuenta de microorganismos por extensión en placa con agar MRS. También se determinó la cuenta microbiana a las muestras completas con tratamiento, con el fin de comparar la inactivación del microorganismo. Se utilizó una cuenta inicial de microorganismos de 10⁷, debido a que es relativamente más fácil alcanzar esta densidad celular.

2.2.8. DETERMINACIÓN DEL pH.

El pH se determinó directamente en la dilución 1:10 (p/v) de las muestras de masa y de agar, presurizadas y sin presurizar. Se utilizó un potenciómetro (BECKMAN).

2.2.9. DETERMINACIÓN DEL DAÑO QUE SE PROVOCA A *Leuconostoc citreum* AL APLICAR LA ALTA PRESIÓN CON CO₂

2.2.9.1. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE MATERIAL INTRACELULAR

Se colocaron los 45 ml de la dilución 1:10 de las muestras presurizadas y sin presurizar en un tubo de centrifuga de 50 ml estéril. Las muestras de agar se centrifugaron a 7500 rpm durante 15 min. y las de masa a 7500 rpm durante 30 min. Se decantó el sobrenadante, y se almacenó a 4°C, para posteriormente determinar la absorbancia a 260 y 280 nm. También se obtuvo un barrido espectral de 220 a 300 nm.

En las muestras de agar se determinó directamente la absorbancia del sobrenadante. Para las muestras de masa se diluyó 1 ml del sobrenadante en 5 ml de peptona al 0.1% para posteriormente determinar la absorbancia, ya que el sobrenadante presentaba turbidez.

2.2. 9.2 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Después de centrifugar la dilución (1:10) a 7500 rpm, se decantó el sobrenadante, se tomó una asada del sedimento y se fijó en un porta-objetos. Se realizaron tinciones de Gram y preparaciones en fresco de las muestras en el microscopio. Se observaron todas las muestras presurizadas a los diferentes tiempos y también las muestras sin presurizar.

2.2.9.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DEL MICROORGANISMO

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la actividad de *Leuconostoc citreum*, se determinó su crecimiento y producción de acidez en las muestras con y sin tratamiento. Después de centrifugar la dilución (1:10) y decantar el sobrenadante de las muestras tratadas durante 15, 30 y 60 min. y sin tratar, se añadió al sedimento 5 ml de peptona al 0.1% y se homogeneizó, se tomaron 2.5 ml de esta suspensión y se resuspendieron en 250 ml de caldo MRS, contenidos en un matraz de 500 ml. El matraz se incubó a 30°C durante 30 h. Se tomaron muestras de 5 ml en intervalos de 2 h para determinar crecimiento y producción de acidez.

2.2.9.3.1 DETERMINACION DE CRECIMIENTO

Se determinó directamente la absorbancia a 540 nm de cada muestra (utilizando como blanco caldo MRS) para obtener la curva de crecimiento del microorganismo.

2.2.9.3.2 DETERMINACION DE ACIDEZ

Los 5 ml de medio de cultivo se diluyeron con 10 ml de H₂O destilada y se titularon con NaOH 0.1N (reactivo analítico, HYCEL de México) utilizando como indicador fenolftaleína. Se reportó el porcentaje de ácido producido con respecto al tiempo de incubación. También se determinó el crecimiento y producción de acidez resuspendiendo otros 2.5 ml del sedimento en caldo MRS con 5% de NaCl. Esto permitió determinar si *Leuconostoc citreum* estaba dañado después de aplicar la alta presión con CO₂.

2.2.10.DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL CALCIO PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE MASA Y AGAR SOBRE LA EFECTIVIDAD DEL TRATAMIENTO.

Debido a que las muestras de masa presentan una elevada concentración de calcio por ser de maíz nixtamalizado y además este mineral también está presente en menor cantidad en las muestras de agar, determinó si su presencia en las muestras podría tener algún efecto en la inactivación de *Leuconostoc citreum* al aplicar la alta presión.

Para esta determinación se inocularon 5ml de caldo MRS con 1 perla de vidrio y se incubó durante 22 h a 30°C. Después de la incubación el medio de cultivo se resuspendió en 45 ml de caldo MRS, contenidos en un tubo de centrifuga de 50 ml, dejándose incubar por 22 h a 30°C. Después de este tiempo de incubación el medio se centrifugó a 7500 rpm durante 15 min. y se decantó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución salina isotónica (0.85% NaCl) adicionada con CaCl₂, ya que esta sal si es soluble en agua y el CaO necesita condiciones ácidas para solubilizarse. Posteriormente se tomaron 0.5 ml del medio de cultivo adicionado con calcio y se depositó en un trozo de papel filtro que sirvió como medio de soporte (figura 8). Las muestras se colocaron en el cartucho donde se aplica la alta presión con CO₂. Se determinaron las condiciones en el equipo. Se aplicaron 100 bar a 45°C durante 2, 4 y 6 min. y por último se determinó la cuenta microbiana antes y después del tratamiento. El diagrama de trabajo se presenta en el ANEXO 3.

La concentración de calcio utilizada se determinó de acuerdo a la cantidad presente en las muestras de masa y de agar. Para determinar la concentración de calcio presente en las muestras de masa se partió de la composición química de la tortilla de maíz (tabla 5).

Tabla 5. Composición química de la tortilla de maíz

% Humedad	41.9
Energía (Kcal)	238.3
Proteína (%)	6.5
Grasa (%)	2.5
Fibra dietética total (%)	7.4
Fibra dietética insoluble	6.3
Cenizas	2.2
Minerales	
Ca (mg/100g)	92.8
Fe (mg/100g)	2.5
Mg (mg/100g)	69.7
P (mg/100g)	162.6
K (mg/100g)	205.3

Ref. (Serna Saldivar *et al*; 1993)

Para determinar la concentración de calcio que contienen las muestras de agar se consideró la información presentada en el manual OXOID. En éste se menciona que existen tres tipos de agar de acuerdo a su composición (tabla 6). A partir de esta información se decidió utilizar la máxima concentración de calcio que pudiera estar presente en el agar.

Tabla 6. Análisis típico del agar.

	L13	L28	L11
Humedad (%)	12.0	7.0	7.0
Cenizas	4.2	3.6	2.0
SO ₄	1.7	0.7	0.9
Nitrógeno total	0.1	0.1	0.1
Ca	400ppm	100ppm	100ppm
Mg	100ppm	70ppm	40ppm
Fe	---	10ppm	---

Ref. (The OXOID Manual, 1990)

Las concentraciones de calcio utilizadas para determinar su efecto en la inactivación de *Leuconostoc citreum* son las siguientes:

Tabla 7. Concentraciones de calcio utilizadas

MUESTRAS	CONCENTRACION DE CALCIO mg/100g
CONTROL	---
MUESTRA 1 (calcio presente en las muestras de masa)	312
MUESTRA 2 (calcio presente en las muestras de agar)	9.69

CAPITULO III

III) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio se enfocó principalmente a la aplicación de la alta presión con CO₂ para lograr la inactivación de *Leuconostoc citreum* en sistemas modelo semi-sólidos (masa de maíz nixtamalizada y agar solidificado) como una alternativa a los métodos tradicionales de conservación de alimentos.

PRIMERA ETAPA

3.1 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES INICIALES DE TRABAJO

Para llevar a cabo la aplicación del tratamiento, primero fue necesario determinar las condiciones iniciales de trabajo, tales como:

- 1) Estandarización de la muestra: peso, tamaño, forma y % de humedad.
- 2) Estandarización de la cuenta inicial de microorganismos en las muestras.
- 3) Determinación de las condiciones iniciales en el equipo: presión, temperatura y tiempo de exposición.

En los primeros experimentos se utilizaron muestras de 5g masa de maíz nixtamalizada con un 60% de humedad y una actividad de agua de 0.950. Para la estandarización de las muestras se consideró la cantidad de muestra que se puede introducir dentro del cartucho cilíndrico donde se aplica la alta presión. Las muestras de masa utilizadas se pueden observar en la figura 8.

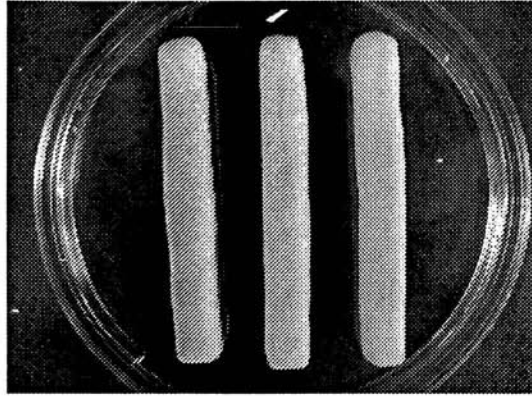


Figura 8. Muestras de masa de maíz nixtamalizado

Al tener las muestras de masa estandarizadas, también fue necesario estandarizar la cuenta inicial de *Leuconostoc citreum* variando sus condiciones de incubación y así obtener diferentes cuentas iniciales que van de 10^5 a 10^{11} UFC/g.

3.1.1. EFECTO DE LA PRESION SOBRE LA INACTIVACION

Primero se determinó el efecto de la presión sobre la inactivación del microorganismo, para lo cual se aplicaron tres presiones diferentes 100, 189 y 316 bar a una temperatura constante de 45°C , durante 15, 30, 45 y 60 min. En la figura 9 se observa la cinética de inactivación obtenida.

VIABILIDAD DE *Leuconostoc citreum* EN CO₂ SC

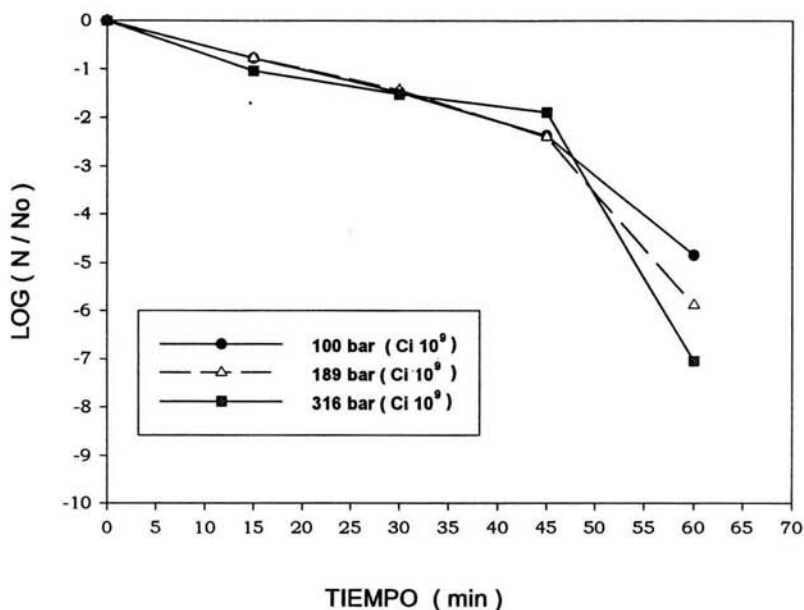


Figura 9. Inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log N/No) en función de la alta presión con CO₂ a 45°C. La cuenta inicial fue de 1.8×10^9 a 5.6×10^9 UFC/g. (tabla I en anexo 1)

En la figura 10 se puede observar que no existe gran diferencia entre las tres presiones aplicadas. Durante los primeros 45 minutos de exposición al tratamiento se observa una mínima diferencia entre las 3 curvas de inactivación. También hasta este tiempo se obtuvo una inactivación lenta del microorganismo, la cual incrementó rápidamente hasta los 60 min. La máxima reducción de la cuenta microbiana se presentó al aplicar una presión de 316 bar durante 60 minutos.

Este comportamiento no concuerda con investigaciones realizadas anteriormente, en las que se ha reportado que un incremento en la presión provoca un mayor daño a las células microbianas y por lo tanto su más rápida y mayor inactivación. Por ejemplo Hong *et al.*,

(2000) reportaron que la muerte de *Lactobacillus plantarum* fue acelerada con un incremento en la presión de CO₂ en un rango de 5 a 7 MPa a 30°C, por lo que propusieron que la presión controla la tasa de solubilidad del CO₂ y su solubilidad en el medio de suspensión. Cuando el CO₂ penetra dentro de las células y su concentración dentro de ellas alcanza un nivel crítico, puede ejercer un efecto letal, dañando el delicado balance químico de los sistemas biológicos.

Según Lin *et al.*, (1994) la alta presión incrementa la solubilización del CO₂ facilitando su contacto con las células, por lo que la inactivación microbiana es gobernada esencialmente por la penetración del CO₂ dentro de las células y su efectividad puede ser mejorada por un incremento en la tasa de transferencia que depende de la presión. Sin embargo la inactivación microbiana obtenida al aplicar el tratamiento durante 60 minutos no es confiable, ya que se obtuvo una cuenta baja, no representativa del microorganismo en las cajas con agar MRS, para tener una cuenta representativa se deben tener mínimo 30 colonias en la caja con la dilución 10⁻¹. Independientemente de la cuenta inicial de microorganismos ya no hay crecimiento al aplicar el tratamiento durante 60 min.

3.1.2. EFECTO DE LA CUENTA INICIAL DE MICROORGANISMOS

Al determinar el efecto de la presión sobre la inactivación de *Leuconostoc citreum* se obtuvo su completa inactivación al aplicar el tratamiento durante 60 minutos. Debido a esto se decidió que era necesario aumentar la cuenta inicial, para así obtener una cuenta representativa al aplicar el tratamiento durante 60 min. Primero fue necesario determinar el efecto de la cuenta inicial de *Leuconostoc citreum* en su inactivación al aplicar la alta presión con CO₂. Para esto se aplicó el tratamiento a las muestras de masa estudiando 3 diferentes cuentas iniciales a una presión y temperatura constantes 316 bar y 45 °C, respectivamente. Los resultados se presentan en la figura 10.

VIABILIDAD DE *Leuconostoc citreum* EN CO₂ SC

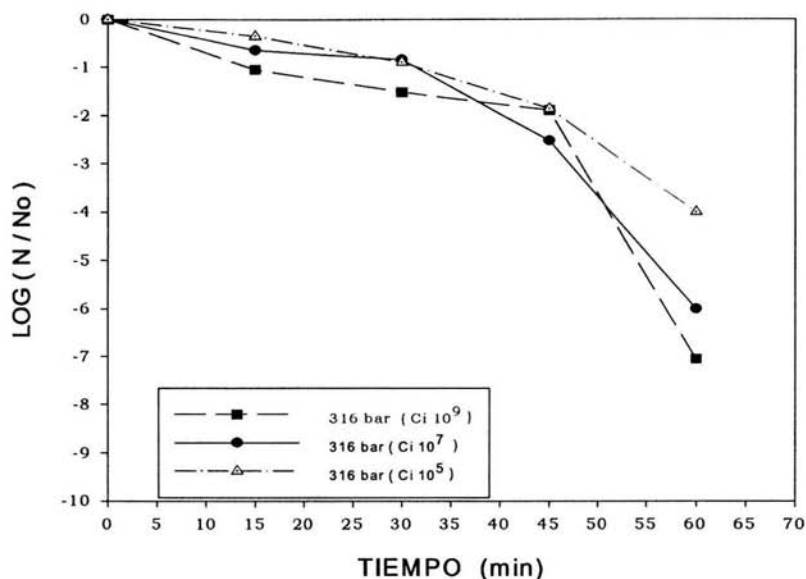


FIGURA 10. Inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en función de su cuenta inicial durante la aplicación de la alta presión con CO₂ a 316 bar y 45 °C. (tabla 2 anexo 1).

No se observaron diferencias en la cinética de inactivación de *Leuconostoc citreum* al variar su cuenta inicial. Se presentó la misma cinética que cuando se varió la presión. Las curvas presentaron tendencias similares para las 3 cuentas iniciales estudiadas, sólo con pequeñas variaciones en la inactivación. Principalmente, la primera parte de las curvas la inactivación es lenta y no se observa diferencia entre las tres diferentes cuentas iniciales utilizadas. Después de los 45 min de exposición al tratamiento la inactivación es mayor y más rápida. La completa inactivación del microorganismo se obtuvo al aplicar el tratamiento durante 60 min, partiendo de una cuenta inicial de 6.5×10^5 y 1.0×10^7 UFC/g. Se observa que al tener una cuenta inicial más alta es mayor la caída en la curva de inactivación. Por medio de estos resultados puede deducirse que una variación en la cuenta inicial de microorganismos no presenta algún efecto considerable sobre la eficiencia en la

inactivación. Aunque es posible que al tener una cuenta mucho más elevada del microorganismo, en comparación con las que aquí se estudiaron, se requiera un mayor tiempo para lograr la inactivación de las células microbianas.

3.1.3. UNIFORMIDAD DE LA INACTIVACION EN LAS MUESTRAS DE MASA

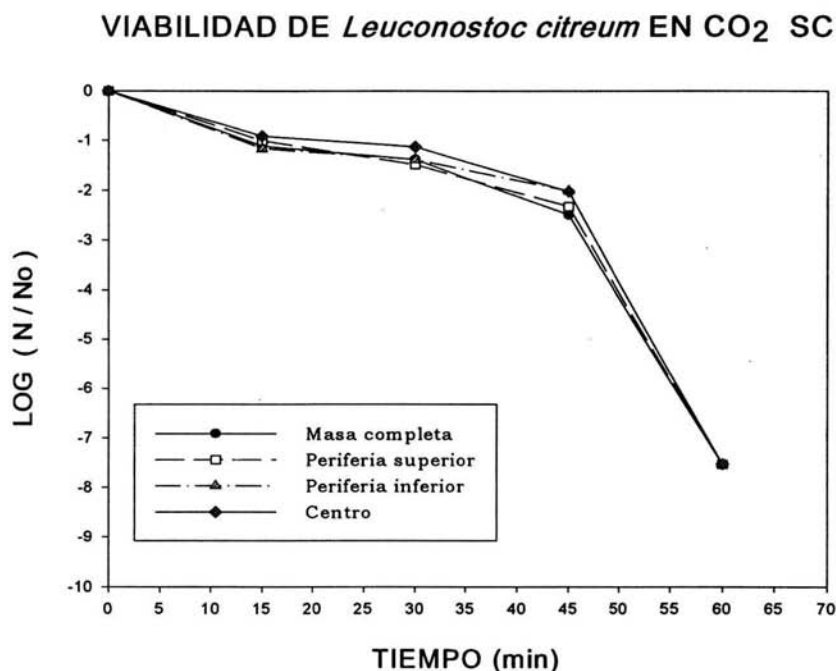
Por otro lado fue necesario verificar si la inactivación de *Leuconostoc citreum* se lleva a cabo de manera uniforme en las muestras. Se llegó a pensar que tal vez la inactivación no se presenta de manera uniforme debido a la conformación y estructura que presenta la masa de maíz, pudiendo evitar de alguna manera la inactivación de los microorganismos retenidos en el interior de la masa. Después de aplicar el tratamiento a las muestras, se dividieron de manera transversal, quedando 3 partes de un mismo tamaño y peso (1.66g). Primero se determinó la cuenta microbiana en cada una de las tres partes sin aplicar el tratamiento, así como en la muestra completa, para verificar que la distribución del microorganismo fuera homogénea, lo cual se comprobó. Se comprobó que la inactivación obtenida en la muestra completa es similar a la obtenida en cada uno de los segmentos (tabla 8), por lo que la distribución del microorganismo en las muestras de masa es uniforme.

Tabla 8. Distribución de *Leuconostoc citreum* en las muestras de masa.

MASA COMPLETA UFC/g	PERIFERIA SUPERIOR UFC/g	PERIFERIA INFERIOR UFC/g	CENTRO UFC/g
1.4x10 ⁸	1.5x10 ⁸	1.1x10 ⁸	1.1x10 ⁸

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos para esta etapa de la investigación.

Figura 11. Uniformidad en la inactivación de *Leuconostoc citreum* ($\text{Log} (N/N_0)$) en función de las diferentes partes de la muestra aplicando una presión de 100 bar y 45°C. La cuenta inicial fue de 3.4×10^9 UFC/g (ver tabla 3 en anexo 1).



Se puede observar que la inactivación se llevó a cabo de manera muy similar en cualquier punto de las muestras (periferias y centro). No se observó diferencia significativa en los índices de inactivación presentados en la tabla 3 (anexo 1). Al parecer la forma y composición de las muestras de masa no limitan la inactivación del microorganismo en su interior, por lo tanto el CO₂ logra penetrar y difundirse uniformemente en cualquier punto de las muestras de masa y posiblemente también dentro de la matriz. Este fenómeno se ha confirmado también en tratamientos con alta presión hidrostática, con los que se evita la deformación de los alimentos debido a que la presión se transmite de manera instantánea y uniforme, es decir, no hay gradientes (Cheftel, 1995).

Es importante resaltar que en este caso también se alcanzó la completa inactivación de *Leuconostoc citreum* al aplicar la alta presión durante 60 min. También en las curvas se observó una más rápida inactivación después de los 45 min. y hasta los 60 min., lo que concuerda con las experimentaciones reportadas previamente en este trabajo (figuras 10 y 11).

3.1.4 EFECTO DEL TIPO DE MUESTRA Y DETERMINACIÓN DE LAS CÉLULAS NO DAÑADAS.

Posteriormente se consideró que la cinética de inactivación de *Leuconostoc citreum* hasta ahora obtenida podría ser diferente si se utiliza otro tipo de muestra, ya que es posible que la composición y estructura de la masa de maíz nixtamalizada pudiera proteger de cierta manera la penetración del CO₂ durante los primeros 45 minutos de exposición al tratamiento. Por este motivo se decidió aplicar el tratamiento en otro tipo de muestra. Se utilizaron muestras de agar solidificado. Primero se determinó el contenido de humedad que deberían tener las muestras de agar, ya que de ésta depende la rigidez requerida para evitar su deformación y gelatinización al aplicar el tratamiento. Se utilizaron muestras de 5g de agar con 93% humedad y una actividad de agua de 0.952. Se decidió aplicar la presión más baja (100 bar) para evitar la posible gelatinización de las muestras debido a su alto contenido de humedad (93%). En la figura 12 se pueden observar las muestras de agar.

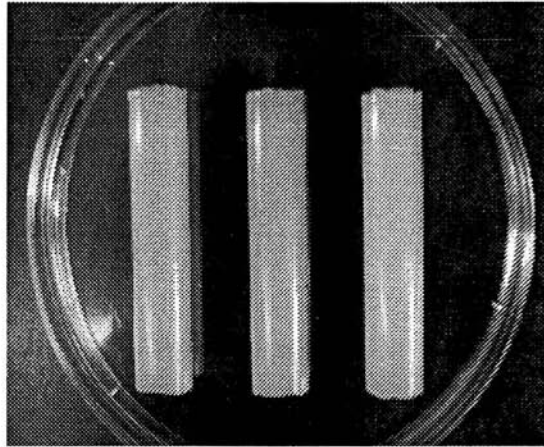


Figura 12. Muestras de agar

Durante esta etapa de la investigación se consideró que sería factible verificar si se encontraban muy dañadas las células microbianas después del tratamiento. Para esto se determinó la viabilidad del microorganismo en un medio de restricción, agar MRS con 5% de sal (medio MRSS), en el cual solo tienen la capacidad de desarrollarse las células no dañadas. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 13. La inactivación obtenida para las muestras de agar se comparó con resultados previamente obtenidos para las muestras de masa.

VIABILIDAD DE *Leuconostoc citreum* EN CO₂ SC

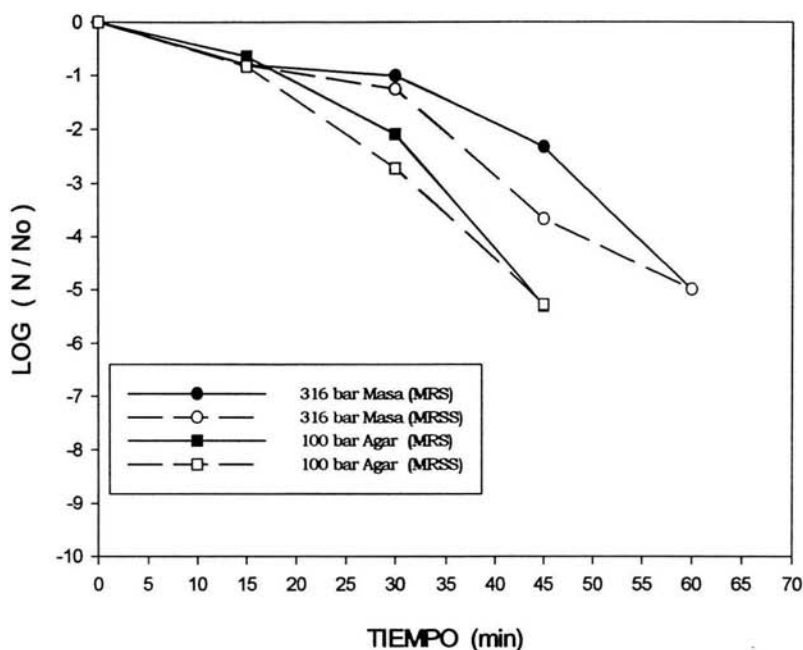


Figura 13. Inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en función del tipo de muestra, aplicando una presión de 100 bar en el agar y 316 bar en la masa a 45°C, la cuenta inicial fue de 1.0×10^7 a 2.2×10^7 UFC/g. Y determinación de la viabilidad del microorganismo en un medio restrictivo (agar MRS con 5% de NaCl).

En la figura 13 se puede observar que la inactivación de *Leuconostoc citreum* se llevo a cabo más rápidamente en las muestras de agar, obteniéndose la completa inactivación del microorganismo a los 45 minutos de exposición al tratamiento. En cambio, para lograr la completa inactivación en las muestras de masa se necesitaron 60 minutos. Se comenzaron a tener diferencias en las curvas de inactivación después de aplicar el tratamiento durante 15 minutos. Esta variación posiblemente se deba a que a diferencia del agar, que se trata de un polisacárido, la masa presenta una composición más compleja, ya que contiene carbohidratos, grasas y proteínas, provocando de alguna manera una mayor resistencia a la

inactivación Hong *et al.*, (1999) propusieron que los compuestos lipídicos posiblemente ayudan a incrementar la resistencia de las células a la alta presión con CO₂. Lin *et al.*, (1996) observaron que *Listeria monocytogenes* fue más resistente al tratamiento con CO₂ cuando el medio de suspensión presentaba grasas y aceites. Por lo que propusieron que la presencia de grasa no permite la penetración del CO₂ dentro de las células por un cambio en la estructura superficial de la pared celular. También la presencia de proteínas y otros constituyentes en los alimentos pueden resistir la penetración del CO₂ dentro de las células.

La actividad de agua en la masa y en el agar es muy parecida 0.950 y 0.952, respectivamente. Esto quiere decir que los dos tipos de muestras presentan la misma proporción de agua libre, aunque el porcentaje de humedad sea mayor en las muestras de agar. La actividad de agua es muy importante ya que de su valor depende la cantidad de agua que podría interaccionar con las moléculas de CO₂ al aplicar el tratamiento, favoreciendo la disminución del pH y por lo tanto la Inactivación del microorganismo.

En cuanto al crecimiento del microorganismo en el medio de restricción (agar MRS con 5% de NaCl) después de aplicarle la alta presión con CO₂, se observa un incremento en la inactivación del microorganismo en comparación con el medio MRS. Las células expuestas al tratamiento durante 45 minutos en las muestras de masa mostraron una mayor reducción en el medio MRSS, alrededor de 1.5 ciclos logarítmicos más que en el medio MRS. Esto quiere decir que el microorganismo después de este tiempo ya se encuentra muy dañado pero podría tener la capacidad de recuperarse si se deja crecer en sus condiciones óptimas.

3.1.5 UNIFORMIDAD DE LA INACTIVACION EN LAS MUESTRAS DE AGAR

Después de determinar la cinética de inactivación de *Leuconostoc citreum* en las muestras de agar, también se verificó si la inactivación se lleva a cabo de manera uniforme. Se procedió en forma análoga a lo realizado para las muestras de masa. Primero se verificó que la cuenta microbiana fuera uniforme en cualquier parte de las muestras de agar (tabla 9)

Tabla 9. Distribución de *Leuconostoc citreum* en las muestras de agar.

AGAR COMPLETO UFC/g	PERIFERIA SUPERIOR UFC/g	PERIFERIA INFERIOR UFC/g	CENTRO UFC/g
1.2x10 ⁷	1.5x10 ⁷	1.3x10 ⁷	1.1x10 ⁷

Posteriormente se aplicó el tratamiento a las muestras completas y después se dividieron en tres partes iguales para determinar su cuenta microbiana. En la figura 14 se presentan los resultados obtenidos para esta parte de la investigación.

VIABILIDAD DE *Leuconostoc citreum* EN CO₂ SC

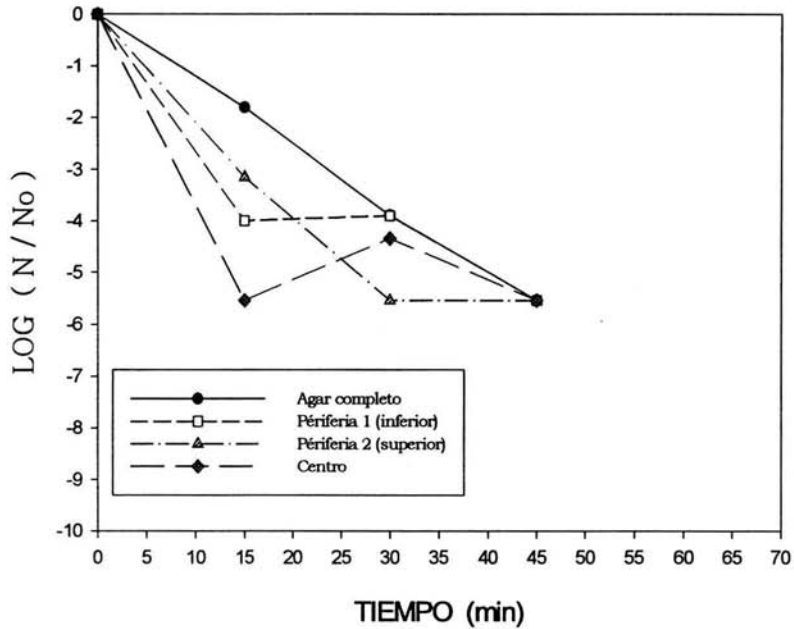


Figura 14. Uniformidad en la inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en las muestras de agar, en función de las diferentes partes de la muestra aplicando una presión de 100 bar y 45°C. La cuenta inicial fue de 3.5×10^7 UFC/g.

En la figura 14 se observa que la inactivación de *Leuconostoc citreum* en las muestras de agar no se llevó a cabo de manera uniforme. Sin embargo los datos no son coherentes por lo que no se pueden obtener conclusiones. Lo único claro es que la inactivación del microorganismo en las muestras de agar completas sigue una cinética de primer orden, obteniéndose la completa inactivación del microorganismo a los 45 minutos de exposición a la alta presión con CO₂. Esto no se logró obtener para cada una de las partes

del agar. Es posible que la inoculación del agar líquido afecte de manera adversa la reproducibilidad de la cuenta microbiana.

También es posible que el agar no se encuentre completamente homogéneo provocando que no se presente la misma rigidez en cualquier punto de la muestra. Lo más probable es que estos resultados no sean reales. Tal vez se tuvo algún error al llevar a cabo la experimentación, principalmente al manejar cada una de las partes de la muestra y realizar las diluciones para obtener la cuenta de microorganismos, ya que no se lograron desbaratar por completo las muestras en el stomacher para poder extraer todas las células microbianas y realizar su cuenta en placa.

Hasta este punto de la investigación todas las curvas obtenidas durante la aplicación de la alta presión con CO₂ en las muestras de masa presentaron dos etapas en la cinética de inactivación de *Leuconostoc citreum*. La primera etapa se caracterizó por una lenta inactivación del microorganismo presentándose hasta los 45 minutos de exposición al tratamiento; posteriormente y hasta los 60 minutos se tuvo una más rápida y completa inactivación de *Leuconostoc citreum*. Esta tendencia se ha observado en la mayoría de las investigaciones realizadas anteriormente sobre la aplicación de la alta presión con CO₂. Ballestra (1996) encontró que las curvas de supervivencia de *Escherichia coli* muestran aparentemente dos distintas etapas en su destrucción, sugiriendo que la inactivación del microorganismo ocurre por un mecanismo muy complejo. La obtención de dos fases en la cinética de inactivación también concuerda con resultados obtenidos por Lin *et al.* (1992) durante la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema líquido.

3.1.6. EFECTO DEL pH

En la mayoría de los experimentos hasta ahora realizados se presentó una ligera disminución después de aplicar la alta presión con CO₂, independientemente del tipo de muestra. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 10.

Tabla 10. Cambios de pH al aplicar la alta presión con CO₂

TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL TRATAMIENTO (minutos)	MUESTRAS DE MASA		MUESTRAS DE AGAR	
	pH	pH	pH	pH
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
15	6.73	6.47	6.51	6.50
30	6.73	6.53	6.51	6.47
45	6.72	6.64	6.51	6.48
60	6.71	6.60	--	--

Generalmente se ha observado una reducción de 0.2 a 1.5 unidades de pH (Erkmen, 1999) y se ha encontrado que la disminución del pH depende de factores tales como el medio de suspensión y el tiempo de exposición al tratamiento.

Posiblemente la muerte de las células microbianas por medio de la alta presión con CO₂ fue provocada por la inactivación de algunas enzimas que interfieren en su metabolismo. Las descarboxilasas pueden ser inhibidas específicamente por una gran exceso de CO₂, interrumpiendo los cambios metabólicos. También por un decremento en el pH y por la extracción de sustancias intracelulares como los fosfolípidos presentes principalmente en la membrana celular.

Todas las experimentaciones realizadas en esta primera etapa de la investigación han permitido obtener una metodología reproducible. También se han logrado estandarizar las condiciones iniciales de trabajo necesarias para la aplicación de la alta presión con CO₂.

SEGUNDA ETAPA

3.2. DETERMINACIÓN DEL DAÑO PROVOCADO A *Leuconostoc citreum* AL APLICAR LA ALTA PRESIÓN CON CO₂

En la segunda parte de la investigación se continuó estudiando el efecto de la alta presión con CO₂ para lograr la inactivación de *Leuconostoc citreum* en los dos sistemas semi-sólidos estudiados anteriormente: i) Masa de maíz nixtamalizada (60% humedad y $a_w = 0.950$) y ii) Agar solidificado (93% humedad y $a_w = 0.952$). Aplicando las mejores condiciones encontradas, se utilizó la cuenta inicial de microorganismos más elevada, se aplicó una presión de 100 bar y una temperatura de 45°C.

Se completó el estudio determinando el daño que pudo provocar el tratamiento al microorganismo por medio de las siguientes técnicas:

- 1) Determinación de absorbancia en UV a 260 y 280nm antes y después del tratamiento, para verificar daño en la membrana, el cual puede provocar la liberación de sustancias que se encuentran en el interior de la célula.
- 2) Observación al microscopio del microorganismo presurizado y sin presurizar, por medio de tinción de Gram y en fresco.
- 3) Determinación de crecimiento y producción de acidez antes y después del tratamiento.
- 4) Determinación de la viabilidad de las células en un medio restrictivo (agar y caldo MRS con 5% de NaCl).

En el anexo 3 se presentan los diagramas de trabajo que se siguieron durante esta parte de la investigación. A continuación se presentan los resultados obtenidos y su discusión para cada una de las muestras estudiadas.

3.2.1 MASA DE MAIZ NIXTAMALIZADA

3.2.1.1 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE INACTIVACION

Para estudiar el daño que se provoca a *Leuconostoc citreum* al aplicarle la alta presión con CO₂. Las muestras de 5 g de masa fueron expuestas a una presión de 100 bar durante 5, 10, 20, 30, 40, 45 y 50 minutos. Se determinó la cuenta microbiana por conteo en placa después del tratamiento. Se utilizaron los dos diferentes medios de cultivo, el medio complejo (MRS) y el medio restrictivo (MRSS) el cual contiene 5% de NaCl. Posteriormente se estudió el daño provocado por el tratamiento al microorganismo. En la figura 15 se presenta la cinética de inactivación obtenida.

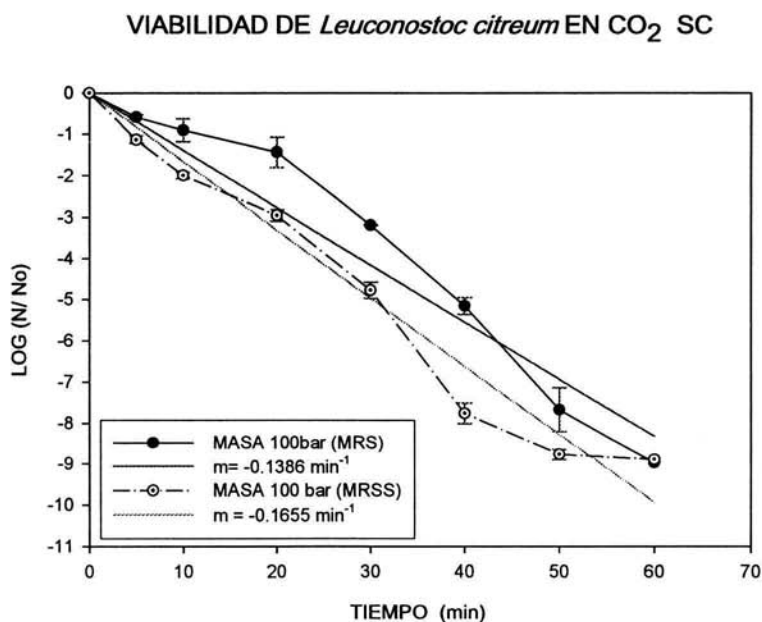


Figura 15. Inactivación de *Leuconostoc citreum*. en las muestras de masa (Log (N/No)) en función de el tiempo de exposición durante la aplicación de la alta presión con CO₂ a 45°C. La cuenta inicial fue de 9.6×10^{10} UFC/g y un pH inicial de 5.94

Como se puede observar en la figura 15 se presentaron dos etapas en la inactivación de *Leuconostoc citreum*; en los primeros 20 minutos se presenta una inactivación lenta del microorganismo en donde solo se logró la reducción de 1.43 ciclos logarítmicos. En la segunda etapa se observa una más rápida y constante inactivación, con una pendiente más definida. Como se ha mencionado anteriormente esto concuerda con estudios previamente realizados sobre otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Salmonella tiphimurium*. A los 60 minutos se obtuvo la completa inactivación del microorganismo, pero ya no se observó la misma tendencia en la inactivación en comparación con los experimentos anteriores.

Es claro que después de 10 minutos se presenta un incremento en la reducción de *Leuconostoc citreum* en el medio MRSS, en comparación con el medio MRS, indicando que los microorganismos sobrevivientes después de este tiempo presentan un severo daño, el cual ya no les permite desarrollarse en el medio restringido. Este daño se incrementa al aumentar el tiempo de exposición del microorganismo a la alta presión, lográndose la completa inactivación del microorganismo a los 60 minutos en los dos medios utilizados. De una cuanta inicial de 9.6×10^{10} UFC/g se obtuvieron menos de 1×10^2 UFC/g, lo que equivale a una disminución de 8.98 ciclos logarítmicos.

El parámetro que más ha influenciado la eficiencia de la inactivación microbiana por alta presión con CO₂ es el tiempo de exposición, aunque en estudios previos se ha obtenido que la temperatura y la presión son muy importantes, ya que estos factores no sólo afectan la inactivación microbiana por las características de transferencia de masa del CO₂ sino también alteran la actividad biológica de las células. Principalmente la presión controla la tasa de solubilización del CO₂ y su solubilidad en el medio de suspensión. Consecuentemente altas presiones incrementan la solubilidad del CO₂, facilitando su contacto con las células. Cuando el CO₂ penetra dentro de las células y su concentración alcanza un nivel crítico puede ejercer un efecto letal afectando o desbalanceando el delicado equilibrio biológico (Hong *et al.*, 1999).

También se puede deducir que la integridad de la célula microbiana puede ser severamente dañada en una etapa muy temprana de la presu.ización con CO₂, ya que al aplicar el tratamiento durante 10 min. se tiene una reducción de más del 90% de las células viables en el medio MRSS.

En la tabla 6 (anexo 1) se puede observar que no hubo disminución del pH, sino un ligero aumento de éste, que puede deberse a que la masa utilizada es nixtamalizada. La cal pudo provocar una reacción ácido-base con el ácido carbónico formado por la disolución del CO₂ con el agua presente en la masa, impidiendo de esta manera la disminución del pH. Una disminución del pH ha sido observada en todas las investigaciones ya reportadas, y en lo general se ha observado una reducción de 0.2 a 1.5 unidades de pH (Erkmen, 1999).

La solubilización del CO₂ puede estar relacionada con los cambios de pH en el medio de suspensión. Particularmente, el CO₂ puede difundirse dentro de la membrana celular y acumularse dentro de las células. Bajo presión es posible que un gran número de moléculas de CO₂ pasen a través de la membrana y disminuyan el pH interno excediendo bastante la capacidad de buffer de citoplasma, colapsándose el gradiente de pH y provocando un aumento del consumo de energía para el mantenimiento de la homeostasis del pH (Kashket, 1987).

3.2.1.2.DETERMINACIÓN DE SUBSTANCIAS LIBERADAS

La determinación de sustancias liberadas permite estudiar el posible daño que presentan las células microbianas después de haberles aplicado la alta presión con CO₂, ya que se puede presentar el rompimiento de la membrana y pared celular provocando la salida de constituyentes vitales al medio extracelular. Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm, ya que algunos grupos funcionales presentes en las proteínas tienen la capacidad de absorber en estas longitudes de onda. Los resultados de esta determinación se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Determinación de sustancias liberadas en las muestras de masa, después de aplicar la alta presión con CO₂.

TIEMPO (min)	ABSORBANCIA	
	260 nm	280 nm
CONTROL	0.4017	0.4605
5	0.5021	0.5640
10	0.4987	0.5887
20	0.3625	0.4420
30	0.5353	0.6084
40	0.4331	0.5128
45	0.5624	0.6306
50	0.4683	0.4975
60	0.4174	0.4969

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, generalmente se tiene un ligero aumento de la absorbancia pero en forma variable, independientemente del tiempo de exposición al tratamiento. Estos resultados no presentan relación con lo que se ha obtenido en investigaciones previas. En estudios sobre *Lactobacillus plantarum* realizados por Hong y Pyun, (2001), se encontró que después de un tratamiento de 20 minutos la absorbancia a

260 y 280 nm se incrementaba considerablemente y después de este tiempo ya no se tenía aumento. Esto lo reafirmaron considerando que después de los 20 min de exposición al tratamiento se provocó la reducción de más del 90% de las células viables. Lin *et al.* (1993) reportaron que los sobrenadantes celulares contienen un bajo nivel de proteínas y sugirieron que el citoplasma no se rompe durante el proceso de inactivación con CO₂ supercrítico. Lo que se esperaría obtener es que al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento se presente un mayor daño en las células microbianas provocando el rompimiento y salida de los componentes intracelulares.

3.2.1.3. OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

Se realizó tinción de Gram a la muestra sin presurizar y a las muestras presurizadas para posteriormente realizar su observación en el microscopio. *Leuconostoc citreum* es una bacteria Gram positiva por lo tanto presenta una pared celular gruesa, en comparación con los Gram negativos. Esta característica la hace menos sensible a la alta presión con CO₂.

En nuestro caso, todas las células microbianas observadas en el microscopio presentaron la misma morfología, sin ninguna deformación visible y el mismo Gram, independientemente del tiempo de exposición al tratamiento. Tal vez el daño provocado a la pared celular no fue tan grande como para poder provocar cambios en la tinción de Gram. Se esperaría que el daño físico que se provoca al aplicar la alta presión alterara el Gram que tiene *Leuconostoc citreum* disminuyendo su capacidad de retención del colorante primario (cristal violeta) en la pared celular, evitando con esto que las células se tiñan de morado y que por lo tanto presenten una coloración roja.

En investigaciones previas se han estudiado los cambios estructurales de las células microbianas utilizando microscopía electrónica. Nakamura, *et al.* (1994) observó cambios morfológicos en levaduras de pan durante y después del tratamiento con CO₂ a 40 atm y

40°C por 5h. Algunas de las deformaciones encontradas incluyeron la aparición de orificios y rugosidades en la superficie celular y algunas células se encontraron completamente reventadas. Observaciones micro-estructurales de células de *Lactobacillus plantarum* mostraron modificaciones en la membrana celular con posible salida del citoplasma, otras características en las células tratadas fueron el alargamiento del espacio periplásmico entre la pared y membrana citoplasmática, fracturas en membranas y vaciado del citoplasma que puede ser localizado en la periferia celular (Hong, et al., 1999).

Los cambios morfológicos en células expuestas a la alta presión con CO₂ pueden variar con la especie del microorganismo, ya que la estructura de la membrana y pared celular pueden ser diferentes. Por ejemplo el daño a una célula microbiana con pared celular que presenta una estructura rígida puede mantener su forma externa después del tratamiento.

3.2.1.4. DETERMINACION DE CRECIMIENTO

La determinación del crecimiento y producción de acidez antes y después de aplicar el tratamiento durante diferentes tiempo nos da una idea de los efectos ocasionados por la alta presión con CO₂ en la actividad metabólica de *Leuconostoc citreum*. Para realizar esta determinación se utilizaron las muestras expuestas durante 10, 30 y 60 minutos

En la figura 16 se presenta el crecimiento de *Leuconostoc citreum* después de aplicarle el tratamiento, tomando como control al microorganismo sin tratamiento.

CRECIMIENTO DE *Leuconostoc citreum* (MASA)

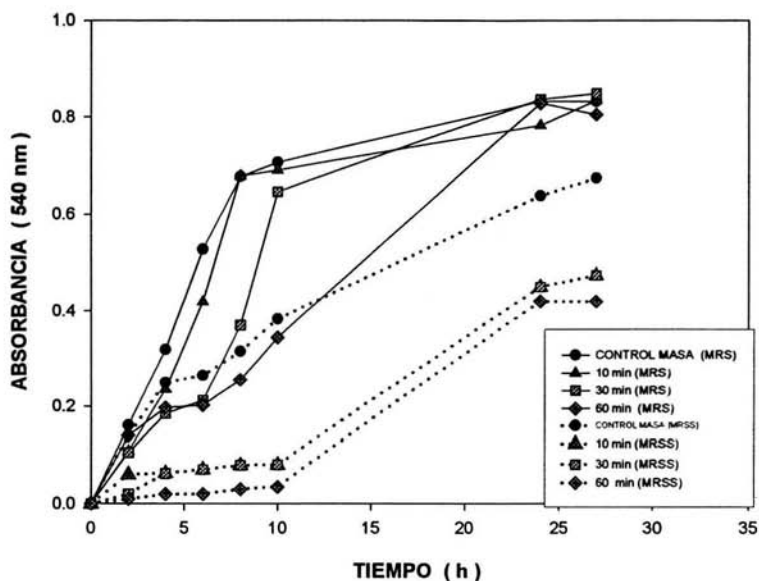


Figura 16. Crecimiento de *Leuconostoc citreum* en caldo MRS y MRSS después de su exposición a la alta presión con CO₂. Al aplicar una presión de 100 bar durante 10, 30 y 60 minutos.

Se puede observar que en el medio MRS las células microbianas de la muestra sin tratamiento crecieron rápidamente sin presentar fase de latencia, en la cual no se produce un aumento inmediato del número de células. La fase exponencial duró hasta las 10h, seguida de la fase estacionaria. En las muestras presurizadas el microorganismo ya no logra crecer de la misma manera y se observa que entre mayor es el tiempo de exposición la fase de latencia es mayor. Esto quiere decir que el microorganismo presenta algún tipo de daño por lo que le cuesta más trabajo recuperarse. Después de las 23 h se observa la completa

recuperación del microorganismo, independientemente de que a las muestras se les haya aplicado el tratamiento durante diferentes tiempos de exposición (10, 30 y 60 min). Después de las 23h de incubación los microorganismos de las muestras tratadas alcanzaron el mismo crecimiento que en la muestra sin tratamiento. Principalmente se puede deducir que al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento los microorganismos disminuyen su velocidad de crecimiento, pero pueden recuperarse después de un tiempo prolongado de incubación.

Al inocular las muestras en el medio restringido (MRSS) se puede observar que también se afecta el crecimiento del microorganismo sin tratamiento, ya que no se obtuvo el óptimo crecimiento del microorganismo; se alcanzó también una absorbancia menor en comparación con el medio MRS. Al parecer la concentración de sal presente en el medio no permitió su óptimo desarrollo. La fase estacionaria se obtiene a una absorbancia menor. Se obtuvo una tendencia similar para los tres tiempos analizados, los cuales presentan un periodo de latencia muy grande alrededor de 10h, el daño puede ser muy similar.

3.2.1.5. DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE ACIDEZ

La producción de ácido láctico se determinó a partir de las mismas muestras analizadas para determinar el crecimiento. La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico producido, ya que es el principal ácido producido por *Leuconostoc citreum*. En la figura 17 se presenta la producción de ácido láctico que presentó el microorganismo antes y después del tratamiento con CO₂.

PRODUCCION DE ACIDO LACTICO (MASA)

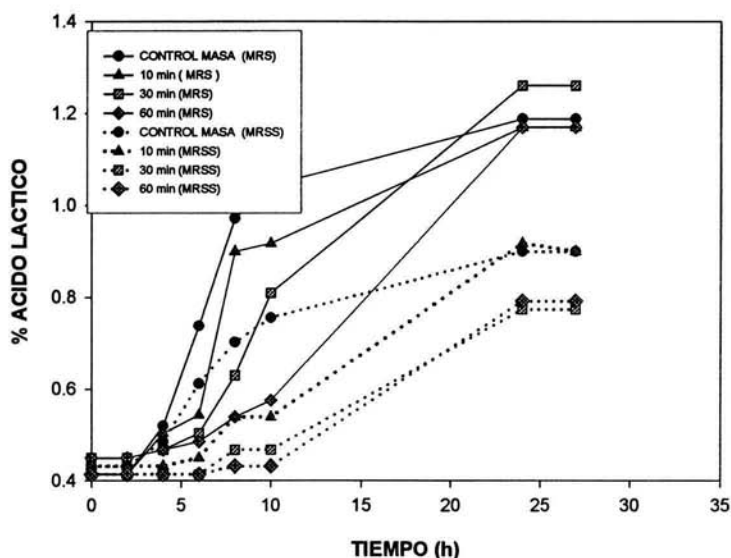


Figura 17. Producción de acidez de *Leuconostoc citreum* después de su exposición a la alta presión con CO₂ en las muestras de masa. Aplicando 100 bar durante 10, 30 y 60 minutos.

Se observa que la producción de acidez está ligada con el crecimiento de *Leuconostoc citreum*. Conforme aumenta el tiempo de exposición al tratamiento, el microorganismo necesita un mayor tiempo para recuperar su capacidad para producir acidez. Como se puede observar en la grafica, *Leuconostoc citreum* necesita alrededor de 10 horas para recuperarse del daño que sufre al aplicarle la alta presión con CO₂. Los microorganismos sin tratamiento y con tratamiento, incubados en el medio restringido, tampoco tuvieron la capacidad de alcanzar la misma acidez, ya que en este medio sólo logran crecer los microorganismos que no se encuentran dañados. Por otra parte fue menor la recuperación de los microorganismos expuestos a un tratamiento de 30 y 60 minutos observándose la misma tendencia en los dos casos.

3.2.2. AGAR SOLIDIFICADO

3.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE INACTIVACION

El efecto de la alta presión sobre *Leuconostoc citreum* en las muestras de agar solidificado, se estudió de la misma manera que en las muestras de masa de maíz. La cuenta inicial fue de 1.1×10^9 UFC/g. Los tiempos aplicados fueron 5, 10, 20, 30, 40 y 50 min. En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos.

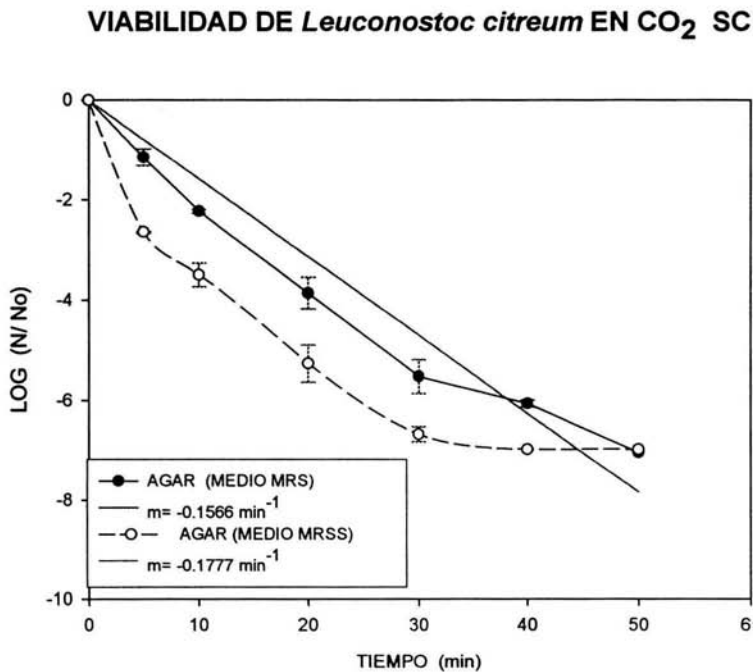


FIGURA 18. Inactivación de *Leuconostoc citreum* en las muestras de agar (Log (N/No)) en función del tiempo de exposición durante la aplicación de la alta presión con CO₂ a 45°C. La cuenta inicial fue de 1.1×10^9 UFC/g en el agar MRS y 9.5×10^8 UFC/g en el agar MRSS, a un pH inicial de 5.90.

En la figura 18 se observa que la inactivación del microorganismo se lleva a cabo más rápidamente en comparación con la masa (figura 15). Esto concuerda con las experimentaciones hechas anteriormente a las muestras de agar, pues al parecer la composición y estructura del agar hace que las células microbianas sean más sensibles al tratamiento. Se observa una pendiente más pronunciada en comparación con la de la masa, donde se necesitaron 30 minutos para lograr casi la completa inactivación del microorganismo, obteniéndose ésta a los 50 minutos. En este caso también es mayor el índice de inactivación en el medio restringido, ya que a partir de los 5 min. de exposición al tratamiento la cuenta es alrededor de 1.3 ciclos logarítmicos menos que en el medio complejo.

En el medio MRSS se obtuvo una completa inactivación del microorganismo a los 40 minutos de exposición al tratamiento. Esto permite deducir que el microorganismo presenta un mayor daño en un menor tiempo. También se obtuvo un ligero aumento del pH, ignorando por completo a que se deba este aumento, ya que como se ha mencionado anteriormente la penetración del CO₂ provoca la acidificación del medio al reaccionar con las moléculas de agua que se encuentren presentes.

3.2.2.2. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS LIBERADAS

La determinación de sustancias liberadas se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras de masa. A continuación se muestran los resultados obtenidos para esta determinación. El barrido espectrofotométrico obtenido se puede observar en el anexo 3.

Tabla 12. Determinación de sustancias liberadas en las muestras de agar después de aplicar la alta presión con CO₂.

TIEMPO (min)	ABSORBANCIA	
	260 nm	280 nm
CONTROL	0.8237	0.6945
5	0.9537	0.7616
10	0.8451	0.6476
20	0.6975	0.4884
30	0.7659	0.5444
40	0.8094	0.5706
50	0.8063	0.5944

Como se puede observar estos resultados tampoco presentan ninguna relación con lo obtenido en estudios previos. Estos resultados no son muy coherentes, pero podría deducirse que la liberación de sustancias del interior de las células microbianas no depende del tiempo de exposición al tratamiento.

3.2.2.3. OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

Se realizó tinción de Gram a la muestra sin presurizar y a las muestras presurizadas para posteriormente realizar su observación en el microscopio. Primero se observó al microorganismo sin tratamiento para verificar que no se tuviera contaminación y verificando que todas las células fueran Gram positivas y que tuvieran el mismo tamaño y forma.

Después se observaron las muestras a las que se les aplicó la alta presión con CO₂, empezando por las que tenían un tiempo menor de exposición al tratamiento para así verificar si las células microbianas presentaban algún cambio conforme aumentaba el tiempo de exposición.

Se observó que independientemente del tiempo de exposición al tratamiento, las células de *Leuconostoc citreum* tenían las mismas características. Como se menciona anteriormente se pensó que se podría afectar el Gram de las células microbianas, principalmente al aplicar el tratamiento durante un mayor tiempo, pero esto no se pudo comprobar. Para poder verificar el daño que presentan las células microbianas se requiere microscopio electrónico, ya que solo de esta manera sería posible el daño celular provocado por la alta presión con CO₂.

3.2.2.4. DETERMINACION DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ACIDEZ

La determinación del crecimiento y producción de acidez antes y después de aplicar el tratamiento durante diferentes tiempos nos da una idea de los efectos ocasionados por la alta presión con CO₂ a la actividad metabólica de *Leuconostoc citreum*. Se utilizaron las muestras expuestas durante 10, 30 y 50 minutos. Se utilizaron también los medios MRS y MRSS en caldo, para determinar la viabilidad del microorganismo. Las muestras se inocularon en 250 ml de caldo MRS y MRSS y se incubaron a 30 °C.

En las siguientes figuras se presenta el crecimiento y producción de acidez que presenta *Leuconostoc citreum* antes y después de aplicar la alta presión con CO₂, al utilizar las muestras de agar.

CRECIMIENTO DE *Leuconostoc citreum* (AGAR)

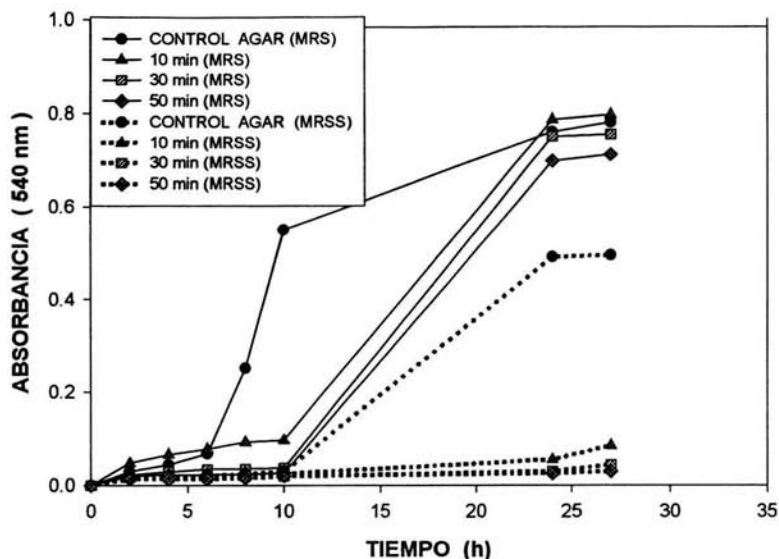


Figura 19. Crecimiento de *Leuconostoc citreum* después de exponerlo a alta presión con CO₂. Aplicando una presión de 100 bar durante 10, 30 y 50 minutos a 45°C.

Las muestras tratadas y sin tratar, inoculadas en el caldo MRS presentan una fase de latencia de 10 h y 6 h respectivamente. El control alcanza más rápidamente la fase estacionaria de crecimiento; alrededor de las 10 h esto quiere decir que el microorganismo se encuentra metabólicamente más activo. El crecimiento del microorganismo en las muestras de agar sin tratamiento no fue el mismo que en las muestras de masa (fig 16). Se esperaría que el crecimiento fuera igual independientemente del tipo de muestra antes de aplicarle el tratamiento, ya que el inóculo inicial se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento. Tal vez al elaborar las muestras de agar se sensibilizó al microorganismo, además de que no se puede recuperar todo el microorganismo durante la homogeneización de las muestras en el stomacher. Todo esto pudo hacer más lenta la recuperación del microorganismo a pesar de que no hubiera sido presurizado. Los microorganismos en las muestras tratadas llevaron a cabo su recuperación mucho más lentamente, alcanzando casi la misma fase estacionaria en

todos los casos después de las 23 h; esto quiere decir que es más difícil pero el microorganismo finalmente logra su completa recuperación.

Los microorganismos presentes en el control y que fueron inoculados en el medio de restricción (MRSS) no lograron desarrollarse de igual manera que en el medio MRS. En aquellos casos donde se obtuvo un menor crecimiento, la alta concentración de sal no permitió su óptimo desarrollo. Los microorganismos presurizados inoculados en el medio de restricción no lograron desarrollarse, observándose la misma tendencia en los 3 tiempos de exposición al tratamiento analizados. Esto quiere decir que después de los 10 min. de exposición al tratamiento se provoca un severo daño al microorganismo impidiendo su recuperación al inocularlo en un medio de restricción.

PRODUCCION DE ACIDO LACTICO (AGAR)

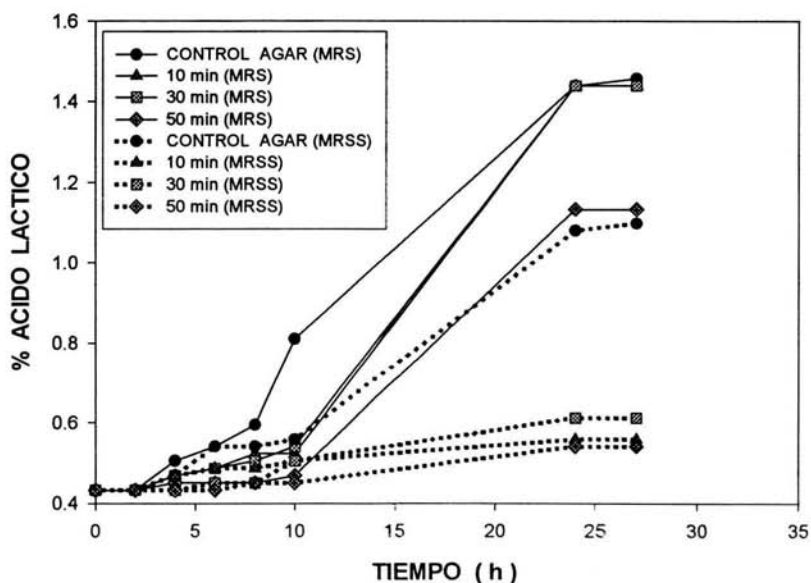


Figura 20. Producción de acidez de *Leuconostoc citreum* después de aplicarle la alta presión en las muestras de agar. Aplicando una presión de 100 bar durante 10, 30 y 50 minutos.

El control y los microorganismos expuestos a 10 y 30 minutos de tratamiento después de 23 h de incubación logran producir la misma acidez. Los microorganismos tratados durante 60 minutos a pesar de ser inoculados en el caldo MRS no logran recuperar por completo la capacidad de producción de acidez lo que quiere decir que se encuentran muy dañados y ni siquiera un medio rico en nutrientes hace que se desarrollen óptimamente después de cierto tiempo de recuperación. Los microorganismos que crecieron en el medio MRS no pudieron producir la misma acidez, en comparación con las muestras de masa (fig 18).

En el medio de restricción también se evitó el desarrollo del microorganismo sin tratamiento, por lo que no logró producir la misma acidez que en el medio MRS y los microorganismos expuestos al tratamiento no pudieron recuperarse evitando la producción de acidez. Se observó la misma tendencia para los tres tiempos analizados.

TERCERA ETAPA

3. EFECTO DEL CALCIO EN LA INACTIVACION DE *Leuconostoc citreum* AL APLICAR LA ALTA PRESION CON CO₂

Después de realizar todos los experimentos anteriores, se consideró la posibilidad de que el calcio que se encuentra presente en las muestras de masa y de agar podría tener algún efecto en la inactivación del microorganismo al aplicar la alta presión con CO₂. Por este motivo se realizó un experimento en el cual se utilizó un medio líquido (solución isotónica, 0.85% NaCl), adicionado con la concentración de calcio que contienen estas muestras.

Se utilizó CaCl_2 disuelto en una solución salina isotónica (0.85% NaCl) de acuerdo a la concentración de calcio que presentan las dos muestras utilizadas. Se utilizó la solución isotónica como control. El volumen de las muestras utilizadas fue de 0.5 ml y se utilizó papel filtro como medio de soporte. Se aplicó una presión de 100 bar a 45°C, durante 2, 4 y 6 minutos. Los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Influencia del calcio en la inactivación de *Leuconostoc citreum* al aplicar la alta presión con CO_2

TIEMPO (min)	CONTROL 96.9 ppm 3120 ppm			
	Cuenta	Cuenta	Cuenta	Cuenta
	Inicial (No)	Final (N)	Final (N)	Final (N)
	UFC/ ml	UFC/ ml	UFC/ ml	UFC/ ml
2	1.1×10^{10}	6×10^2	$< 1 \times 10^2$	4×10^2
4	1.1×10^{10}	$< 1 \times 10^2$	$< 1 \times 10^2$	$< 1 \times 10^2$
6	1.1×10^{10}	$< 1 \times 10^2$	$< 1 \times 10^2$	$< 1 \times 10^2$

Como se puede observar en los resultados anteriores, la inactivación fue muy similar, independientemente de la concentración de calcio utilizada. Lo más interesante es que al utilizar una muestra líquida, la inactivación de *Leuconostoc citreum* fue mucho más rápida en comparación con las muestras de masa y de agar. En la figura 21 se hace una comparación de la cinética de inactivación del microorganismo

VIABILIDAD DE *Leuconostoc citreum* EN CO₂ SC

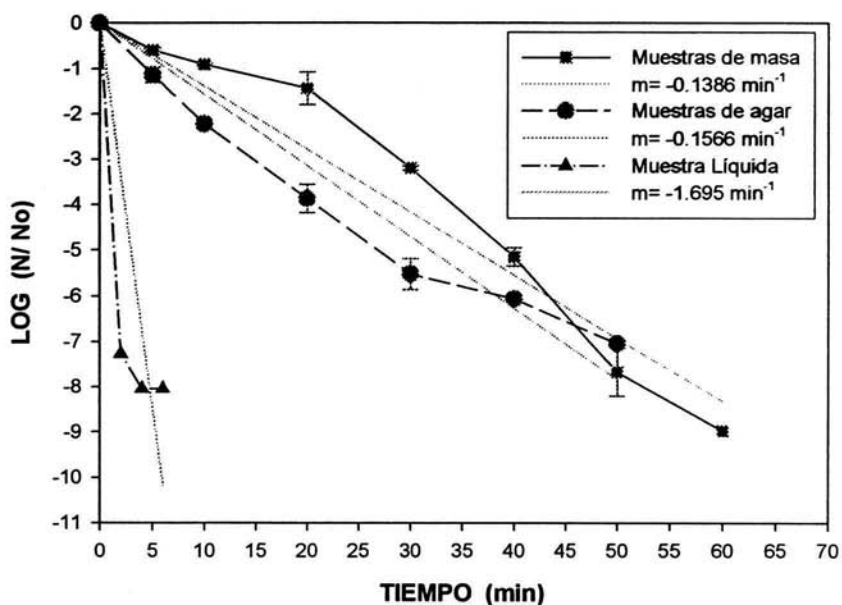


Figura 21. Comparación de la inactivación de *Leuconostoc citreum* en los tres diferentes tipos de muestras estudiadas. Se aplica una presión de 100 bar a 45°C.

Como se puede observar en la figura 21 la inactivación de *Leuconostoc citreum* es muy similar en las muestras de masa y de agar. Las constantes de inactivación son muy parecidas $m = -0.1386 \text{ min}^{-1}$ para las muestras de masa y $m = -0.1566 \text{ min}^{-1}$ para las muestras de agar. Las curvas de inactivación de estas dos muestras siguen casi la misma tendencia. Se obtuvo una diferencia muy drástica al utilizar una muestra líquida (sol. isotónica), utilizando papel filtro como medio de soporte, pues en este caso la constante de inactivación fue de -1.695 min^{-1} . Al parecer la actividad acuosa es muy importante, ya que la presencia de carbohidratos, lípidos y proteínas en las muestras semi-sólidas pueden interferir en la difusión del CO₂. Oser y Knorr (1993) encontraron que la reducción de la actividad de agua de 0.98-1.0 a 0.94-0.96 resulta en una marcada reducción de la inactivación de los microorganismos suspendidos en los alimentos.

CONCLUSIONES:

Esta investigación demostró que la alta presión con CO₂ es un tratamiento efectivo para la inactivación de bacterias lácticas. Se logró la completa inactivación de *Leuconostoc citreum* por medio de la alta presión con CO₂, y el grado de inactivación fue diferente para cada tipo de muestra.

En las muestras de masa la inactivación completa se obtuvo al aplicar el tratamiento durante 60 minutos, lográndose disminuir alrededor de 10 órdenes de magnitud la cuenta microbiana y en las muestras de agar se requirieron entre 40 y 50 minutos para disminuir alrededor de 7 órdenes de magnitud la cuenta microbiana. La integridad de la membrana celular puede ser severamente dañada en una etapa temprana del tratamiento (15 minutos de exposición) lo que provoca una reducción de más del 90% de las células viables en estos dos tipos de muestra.

Al utilizar un medio líquido como medio de soporte para aplicar la alta presión con CO₂ fue mucho más rápida la inactivación de *Leuconostoc citreum*; únicamente se requirieron 4 minutos para lograr su completa inactivación partiendo de una cuenta inicial de 1×10^{10} UFC/ml. Posiblemente los compuestos lipídicos, proteínas y carbohidratos presentes en las muestras semi-sólidas utilizadas ayudaron a incrementar la resistencia de las células al tratamiento. Además un medio rico en aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales puede ser más protector que un medio pobre en nutrientes que en este caso fue la muestra líquida. Al parecer un menor contenido de agua presente en las muestras de masa y de agar puede afectar la inactivación del microorganismo, evitando una rápida difusión del CO₂.

Aunque no se observó una considerable disminución del pH en las muestras después de aplicar el tratamiento, seguramente el efecto del pH es más relevante a nivel intracelular. Puede ser que bastantes moléculas de CO₂ pasen a través de la membrana y disminuyan el

pH interno excediendo la capacidad de buffer de las células, induciendo la inhibición de sus sistemas metabólicos esenciales.

El hidróxido de calcio presente principalmente en las muestras de masa puede reaccionar con el ácido carbónico formado por la disolución del CO₂ funcionando como un intenso buffer en el medio, impidiendo la disminución del pH durante el tratamiento y con esto el microorganismo pudo tener una mayor resistencia a la inactivación.

Se pudo comprobar que la alta presión con CO₂ provoca cambios en las características fisiológicas de *Leuconostoc citreum*, principalmente alteraciones en su actividad metabólica.

Según lo observado en el microscopio las células microbianas mostraron su pared celular intacta. Sin embargo es posible que cambien algunas características de las células tratadas como son el alargamiento del espacio periplásmico, fracturas en las membranas y el vaciado del citoplasma. Esto podría sólo ser visible utilizando un microscopio electrónico.

La inactivación de las células microbianas fue influenciada principalmente por el tiempo de exposición al tratamiento. No se encontraron cambios en la inactivación al aumentar la presión ó al variar la cuenta inicial de microorganismos. También se encontró que la muerte celular se lleva a cabo de manera uniforme en las diferentes partes de las muestras de masa.

Los resultados muestran que el tratamiento con alta presión con CO₂ podría ser usado como un tratamiento no térmico efectivo para la conservación de alimentos.

El tratamiento con alta presión es todavía costoso, ya que requiere de un alto capital inicial lo cual limita su aplicación a productos de alto valor. Sin embargo se puede esperar que estos costos bajen paulatinamente a consecuencia del progreso en esta tecnología. Una clara ventaja del tratamiento es la baja energía requerida y la estabilidad de pequeñas moléculas a través del tratamiento con alta presión. Consecuentemente la ventaja es que la

presión puede provocar un efecto menor sobre la calidad de alimentos ricos en vitaminas en comparación con los tratamientos con calor.

Con esta tecnología, tanto los alimentos y como sus envases pueden ser esterilizados a una temperatura cercana a la temperatura ambiente y en un tiempo en el orden de minutos. Las presiones relacionadas con este proceso están usualmente por debajo de los 1000 bar. Algo muy importante es que se espera que los productos alimenticios procesados por este método tengan una vida de anaquel más larga en comparación con los productos procesados con un tratamiento térmico. Esta tecnología es particularmente benéfica para alimentos que contienen pequeñas partículas o son sensibles al calor, como por ejemplo: leche, jugos de frutas, cervezas, vinos, salsas y alimentos semi-sólidos como el jamón y las masas.

RECOMENDACIONES:

- ❖ Se podrían estudiar otros microorganismos, principalmente más resistentes a este tipo de tratamientos, tales como las esporas para poder conocer la completa efectividad del tratamiento.

- ❖ También podrían estudiarse otros tipos de muestras con diferentes constituyentes para determinar su efecto en la inactivación de los microorganismos. Realizar estudios en muestras de un mayor tamaño, utilizando un equipo con mayor capacidad.

- ❖ En investigaciones posteriores sería muy importante determinar el daño que se provoca a la membrana celular mediante microscopía electrónica, así como determinar el pH intracelular.

REFERENCIAS

- Arreola, A.G., Balaban, M.O., Wei, C.I., Peplow, A.J., Marshall, M. and Cornell, J. 1991. Effect of supercritical carbon dioxide on microbial populations in single strong orange juice. *J. Food Quality* (14), 275-284.
- Arroyo, G., Sanz, P.D., Préstamo, G. 1997. Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables. *J. Appl. Microbiol.* (82), 735-742.
- Askar, A. 1998. Minimally processed tropical fruits. *Fruits Process.* 8(8), 339-343.
- Ballestra, P., Silva, A.D. and Cuq, J.L. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. *J. Food Sci.* (61), 829-831.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palau, E., Swanson, B.G. 1998. Procesados de alimentos con alta presión. En: Conservación no térmica de alimentos, pp. 9-48. Edit. Acribia S.A. Zaragoza.
- Bridson, E. Y. The manual OXOID. 6th Edición 1990. pág 3-14.
- Cano, M.P., Hernández, A., Ancosde, B. 1997. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products, *J. Food Sci.* (62), 85-88.
- Cheftel, J.C. 1995. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* (1), 75-90.
- Cheftel, J.C. 1998. Commercial pressurized foods in Japan. En: High pressure food science, bioscience and chemistry N.S. Isaacs (pp. 506-507). The Royal Society of Chemistry Cambridge.

-
- Chen, J.S., Balaban, M.O., Wei, C.I., Marshal, M.R. and Hsu, W.Y. 1992. Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* (40), 2345-2349.
 - Chong, P.L., Fortes, P.A., Jameson, D.M. 1985. Mechanisms of inhibition of Na/K ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* (260), 14484-14490.
 - Dixon, N.M. and Kell, D.B. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* (67), 109-136.
 - Drake, M.A., Harrison, S.L., Asplund, M., Barbosa-Cánovas, G., Swanson, B.G. 1997. High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of cheddar cheese. *J. Food Sci.* (62,9), 843-845.
 - Erkmen, O. 2000. Kinetic studies on the high pressure carbon dioxide inactivation of *Salmonella typhimurium*. *J. of Food Eng.* (50), 25-28.
 - Farkas, D.F., Hoover, D.G., 2000. High pressure processing. *J. Food Sci.*, supplement, 47-64.
 - Farr, D. 1990. High pressure technology in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* (1), 14-16.
 - Gross, M. and Jaenické, R. 1994. Proteins under pressure. *Eur. J. Biochem.* (221), 617-630.
 - Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, J.R.E., Dik, R., Hintlian, C. and Keane, L. 1989. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *J. Food Safety.* (9), 253-265.

-
- Hayashi, R. 1989. Applications of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development. En: *Engineering and food*. (2), 815-826.
 - Hong, S.I., Pyun, Y.R. 1999. Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. *J. Food Sci.* (64), 728-733.
 - Hong, S.I., Pyun, Y.R. 2001. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide treatment. *Int. J. Food Microbiol.* (63), 19-28.
 - Hoover, D.G., Metrick, C. 1989. Biological effects on high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* 43(3), 94-107.
 - Hoover, D.G. 1993. Pressure effects on biological systems. *Food technol.* 47(6), 150-154.
 - Hoover, D.G. 1997. Minimally processed fruits and vegetables: reducing microbial load by nonthermal physical treatments. *Food Technol.* 51(6), 66-71.
 - Isenschmid, A., Marison, I.W. and Stockar, V. 1995. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells. *J. Biotechnol.* (39), 229-237.
 - Ishikawa, H., Shimoda, M., Kawano, T. and Osajima, Y. 1995. Inactivation of enzymes in an aqueous solution by micro-bubbles of supercritical carbon dioxide. *Biosci. Biochem.* (59), 628-631.
 - Jarzebski, A.B. and Malinowski, J.J. 1995. Potentials and prospects for application of supercritical fluid technology in bioprocessing. *Process Biochem.* 30(4), 343-352.

-
- Kamihira, M., Taniguchi, M., Kobayashi, T. 1987. Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* (51), 407-412.
 - Kimura, K., Ida, M., Yosida, Y., Ohki, K., Fukumoto, T., Sakui, N. 1994. Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavor components, hue and nutrients during storage. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(8), 1386-1391.
 - Knorr, D. 1993. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* 47(6), 156-161.
 - Kowalski, E., Ludqing, H. Tauscher, B. 1992. Hydrostatic high pressure to sterilize food. Application to pepper. *Dtsch. Lebensm-Rundsch.* (88), 74-75.
 - Ledward, D.A., Johnston, D.E., Earnskaw, R.G., Hasting, A.P.M. 1995. En: High pressure processing-the potential. High pressure processing of foods. pp. 1-6, Edit. Nottingham University press.
 - Lin, H.M., Yang, E. and Chen, L.F. 1993. Inactivation of *Leuconostoc dextrachicum* with carbon dioxide under pressure *Chem. Eng.* 5(52), 1329-1334.
 - Lin, H.M., Cao, N. and Chen, L.F. 1994. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* (59), 657-659.
 - Madrid A., Gómez J.M. Los gases en la alimentación. Edit. A. Madrid Vicente Ediciones. 1991. pág 16.
 - Mc Farland, I. 1973. A new fabrication method for large high pressure vessels. *Proc 2nd International conference on Pressure Vessel Technology.* 1152-1158.

-
- Mertens, B. 1993. Packaging aspects of high-pressure food processing technology. *Pack. Technol. Sci.* 6(1), 31-36.
 - Mertens, B., Diplace, G. 1993. Engineering aspects of high pressure technology in food industry. *Food Technol.* 47(6), 164-169.
 - Mellar, R.S., Cooper, K.L., Knorr, D. 2000. High pressure sterilization of food. *Food Technol.* 54(11), 67-71.
 - Poulter, T.C. 1951. High pressure apparatus. US. Patent No. 2554499.
 - Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G. Swanson, B.G. 1995. The pressure builds for better food processing. *Chem. Eng. Prog.* March 45-53.
 - Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A.M., Ibar, A., Barbosa, G. 1997. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria.* (33), 32-43.
 - Serna Saldívar S. Química almacenamiento e industrialización de los cereales. Edit. AGT s.a. 1996. Pág. 470.
 - Shin, J.K. and Pyun, Y.R. 1997. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed-microwave irradiation. *J. Food Science.* 62(1) 163-166.
 - Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *J. Food Sci Technol.* (9), 152-158.
 - Taniguchi, M., Suzuki, H., Sato, M. And Kobayashi, T. 1987. Sterilization of plasma powder by treatment with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* (51), 3425-3426.

-
- Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., Simai-Gándara, J. 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y tecnología alimentaria*. 3(2), 66-80.
 - Van Eijs, A.M.M., Woke, J.M.P. Ten Brink, B. and Dekker, K.A. 1998. Downstream processing of fermentation broths with supercritical carbon dioxide. Nice, France; International Symposium on Supercritical Fluids. 17-19.10.1988. pp 799-805.
 - Zander, K. 1980. Some safety aspects of wire-wound pressure vessels and press frames for isostatic pressing and industrial applications in general. Proc. 4th Int. Conf. on Pressure Vessels Technology. 549-560.
 - Zimmerman, F., Bergman, C. 1993. Isostatic High pressure equipment for food preservation. *Food Technol.* 47(6), 162-163.
 - Zobell, C.E., Cobet, A.B. 1962. Growth reproduction and death rates of *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J. Bacteriol.* (54) 1228-1236.

ANEXOS

ANEXO 1 TABLAS DE RESULTADOS

TABLA 1 . Inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en función de la alta presión con CO₂ a 45°C. Partiendo de una cuenta inicial de 1.8x10⁹ a 5.6x10⁹ UFC/g.

PRESION (Bar)	TIEMPO (min)	pH		Cuenta inicial (No) (UFC/ g)	Cuenta final (N) (UFC/ g)	TIEMPO (min)	Log (N/No)		
		Inicial	Final				100 bar	189 bar	316 bar
100	15	6.69	6.19	4.5x10 ⁹	1.9x10 ⁸	15	-1.37	-1.31	-1.04
	30	6.69	6.31	4.5x10 ⁹	1.5x10 ⁸	30	-1.48	-1.44	-1.51
	45	6.69	6.45	4.5x10 ⁹	1.9x10 ⁷	45	-2.37	-2.40	-1.89
	60	6.63	6.58	1.8x10 ⁹	1.3x10 ⁵	60	-4.85	-5.88	-7.05
189	15	6.69	6.13	4.5x10 ⁹	2.2x10 ⁸				
	30	6.69	6.33	4.5x10 ⁹	1.6x10 ⁸				
	45	6.69	6.42	4.5x10 ⁹	1.8x10 ⁷				
	60	6.63	6.57	1.8x10 ⁹	1.2x10 ⁴				
316	15	6.86	6.36	5.6x10 ⁹	5.1x10 ⁸				
	30	6.86	6.54	5.6x10 ⁹	1.7x10 ⁸				
	45	6.86	6.62	5.6x10 ⁹	7.2x10 ⁷				
	60	6.86	6.54	5.6x10 ⁹	5.2x10 ²				

TABLA 2. Inactivación de *Leuconostoc citreum*. (Log (N/No)) en función de su cuenta inicial durante la aplicación de la alta presión con CO₂ a 316 bar y 45 °C.

TIEMPO (min)	pH		Cuenta inicial (No) (UFC/ g)	Cuenta final (N) (UFC/ g)	TIEMPO (min)	Log (N/No)		
	Inicial	Final				6.5x10 ⁵ UFC/ g	1.0x10 ⁷ UFC/ g	5.6x10 ⁹ UFC/ g
15	6.80	6.58	6.5x10 ⁵	2.9x10 ⁵	15	-0.35	-0.80	-1.04
30	6.80	6.67	6.5x10 ⁵	8.3x10 ⁴	30	-0.89	-1.01	-1.51
45	6.80	6.91	6.5x10 ⁵	9.1x10 ³	45	-1.86	-2.33	-1.89
60	6.80	6.84	6.5x10 ⁵	<1x10 ²	60	>-3.81	>-5.00	-7.05
15	6.85	6.66	1.0x10 ⁷	1.6x10 ⁶				
30	6.85	6.69	1.0x10 ⁷	9.8x10 ⁵				
45	6.85	6.90	1.0x10 ⁷	4.7x10 ⁴				
60	6.85	6.80	1.0x10 ⁷	<1x10 ²				
15	6.86	6.36	5.6x10 ⁹	5.1x10 ⁸				
30	6.86	6.54	5.6x10 ⁹	1.7x10 ⁸				
45	6.86	6.62	5.6x10 ⁹	7.2x10 ⁷				
60	6.86	6.54	5.6x10 ⁹	5.0x10 ²				

TABLA 3. Uniformidad en la inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en función de las diferentes partes de la muestra aplicando una presión de 100 bar y 45°C. Partiendo de una cuenta inicial de 3.4×10^9 UFC/g.

Parte de la muestra	Tiempo (min)	pH		Cuenta inicial (No) (UFC/g)	Cuenta final (N) (UFC/g)
		Inicial	Final		
Completa	15	6.56	6.51	3.4×10^9	2.6×10^8
	30	6.56	6.49	3.4×10^9	1.4×10^8
	45	6.56	6.53	3.4×10^9	1.1×10^7
	60	6.56	6.40	3.4×10^9	$< 1 \times 10^2$
Periferia superior	15	6.56	6.53	3.4×10^9	3.3×10^8
	30	6.56	6.57	3.4×10^9	1.1×10^8
	45	6.56	6.55	3.4×10^9	1.6×10^7
	60	6.56	6.50	3.4×10^9	$< 1 \times 10^2$
Centro	15	6.56	6.74	3.4×10^9	4.1×10^8
	30	6.56	6.70	3.4×10^9	2.5×10^8
	45	6.56	6.66	3.4×10^9	3.2×10^7
	60	6.56	6.69	3.4×10^9	$< 1 \times 10^2$
Periferia inferior	15	6.56	6.40	3.4×10^9	2.3×10^8
	30	6.56	6.56	3.4×10^9	1.4×10^8
	45	6.56	6.58	3.4×10^9	3.3×10^7
	60	6.56	6.57	3.4×10^9	$< 1 \times 10^2$

TIEMPO (min)	Log (N/No)			
	Masa completa	Periferia superior	Centro	Periferia inferior
15	-1.116	-1.012	-0.918	-1.169
30	-1.385	-1.490	-1.133	-1.385
45	-2.490	-2.327	-2.026	-2.012
60	>-7.531	>-7.531	>-7.53	>-7.531

TABLA 4. Inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en función del tipo de muestra, a aplicando una presión de 100 bar en el agar y 316 bar en la masa a 45°C, partiendo de una cuenta inicial de 1.0×10^7 a 2.2×10^7 UFC/g. y determinación de la viabilidad del microorganismo en un medio restrictivo (agar MRS con 5% de NaCl).

Muestra y medio de cultivo	Tiempo (min)	pH		Cuenta Inicial (No) (UFC/g)	Cuenta Final (N) (UFC/g)
		Inicial	Final		
Masa/ MRS (0% NaCl)	15	6.85	6.66	1.0×10^7	1.6×10^6
	30	6.85	6.69	1.0×10^7	9.8×10^5
	45	6.85	6.90	1.0×10^7	4.7×10^4
	60	6.85	6.80	1.0×10^7	$< 1 \times 10^2$
Masa /MRSS (5% NaCl)	15	6.85	6.66	1.1×10^7	1.7×10^6
	30	6.85	6.69	1.1×10^7	6.0×10^5
	45	6.85	6.90	1.1×10^7	2.4×10^3
	60	6.85	6.80	1.1×10^7	$< 1 \times 10^2$
Agar/MRS (0% NaCl)	15	5.51	5.50	2.2×10^7	4.5×10^6
	30	5.51	5.47	2.2×10^7	1.6×10^5
	45	5.51	5.48	2.2×10^7	$< 1 \times 10^2$
Agar/MRSS (5% NaCl)	15	5.51	5.50	1.9×10^7	2.8×10^6
	30	5.51	5.47	1.9×10^7	3.6×10^4
	45	5.51	5.48	1.9×10^7	$< 1 \times 10^2$

TIEMPO (min)	Log (N/No)			
	Masa (316 bar)		Agar (100 bar)	
	MRS	MRSS	MRS	MRSS
15	-0.80	-0.81	-0.648	-0.832
30	-1.01	-1.26	-2.097	-2.722
45	-2.33	-3.67	>-5.30	>-5.28
60	>-5.00	>-5.00	---	---

TABLA 5. Uniformidad en la inactivación de *Leuconostoc citreum* (Log (N/No)) en las muestras de agar. En función de las diferentes partes de la muestra aplicando una presión de 100 bar y 45°C. Partiendo de una cuenta inicial de 3.5×10^7 UFC/g.

Parte de la muestra	Tiempo (min)	pH		Cuenta inicial (No) (UFC/g)	Cuenta final (N) (UFC/g)
		Inicial	Final		
Completa	15	6.29	5.69	3.5×10^7	5.5×10^5
	30	6.29	6.25	3.5×10^7	4.5×10^3
	45	6.29	6.03	3.5×10^7	$< 1 \times 10^2$
Periferia superior	15	6.29	5.94	3.5×10^7	3.5×10^7
	30	6.29	5.64	3.5×10^7	$< 1 \times 10^2$
	45	6.29	5.82	3.5×10^7	$< 1 \times 10^2$
Centro	15	6.29	6.04	3.5×10^7	$< 1 \times 10^2$
	30	6.29	6.09	3.5×10^7	2.0×10^3
	45	6.29	5.55	3.5×10^7	$< 1 \times 10^2$
Periferia inferior	15	6.29	5.94	3.5×10^7	4.3×10^3
	30	6.29	6.02	3.5×10^7	5.4×10^3
	45	6.29	5.87	3.5×10^7	$< 1 \times 10^2$

TIEMPO (min)	Log (N/No)			
	Agar completo	Periferia superior	Centro	Periferia inferior
15	-1.8037	-3.0669	>-5.544	-3.9105
30	-3.8908	>-5.544	-4.2430	-3.0116
45	>-5.544	>-5.544	<-5.544	>-5.544

TABLA 6. Inactivación de *Leuconostoc citreum*. en las muestras de masa (Log (N/No)) en función de el tiempo de exposición durante la aplicación de la alta presión con CO₂ a 45°C. Partiendo de una cuenta inicial de 9.6×10^{10} UFC/g y un pH inicial de 5.94

Muestra y medio de cultivo	Tiempo (min)	PH final	Cuenta Inicial (No)	Cuenta final (N)
Masa/MRS (0% NaCl)	5	6.26	9.6×10^{10}	2.3×10^{10}
	10	6.48	9.6×10^{10}	1.2×10^{10}
	20	6.51	9.6×10^{10}	3.5×10^9
	30	6.53	9.6×10^{10}	6.3×10^7
	40	6.45	9.6×10^{10}	6.9×10^5
	50	6.16	9.6×10^{10}	2.0×10^3
	60	6.21	9.6×10^{10}	$< 1 \times 10^2$
Masa/MRSS (5% NaCl)	5	6.26	7.9×10^{10}	5.5×10^9
	10	6.48	7.9×10^{10}	8.1×10^8
	20	6.51	7.9×10^{10}	2.0×10^8
	30	6.53	7.9×10^{10}	1.4×10^6
	40	6.45	7.9×10^{10}	1.1×10^3
	50	6.16	7.9×10^{10}	1.4×10^2
	60	6.21	7.9×10^{10}	$< 1 \times 10^2$

TIEMPO (min)	Log (N/No)	
	Masa (100bar)	
	MRS	MRSS
5	-0.5954	-1.3390
10	-0.9090	-1.9955
20	-1.4327	-2.6170
30	-3.1845	-4.7692
40	-5.1505	-5.8267
50	-7.6706	-8.7699
60	-8.9822	-8.8976

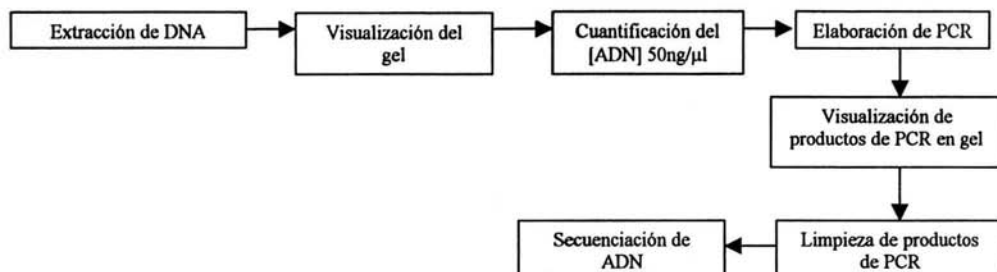
TABLA 7. Inactivación de *Leuconostoc citreum* en las muestras de agar (Log (N/No)) en función del tiempo de exposición durante la aplicación de la alta presión con CO₂ a 45°C. Partiendo de una cuenta inicial de 1.1x10⁹ UFC/g en el agar MRS y 9.5x10⁸ UFC/g en el agar MRSS, a un pH inicial de 5.90.

Muestra y medio de cultivo	Tiempo (min)	PH final	Cuenta Inicial (No)	Cuenta final (N)
Agar/MRS (0% NaCl)	5	6.14	1.1x10 ⁹	4.5x10 ⁷
	10	6.23	1.1x10 ⁹	6.5x10 ⁶
	20	6.13	1.1x10 ⁹	1.5x10 ⁵
	30	6.23	1.1x10 ⁹	8.3x10 ³
	40	6.15	1.1x10 ⁹	9.5x10 ²
	50	6.19	1.1x10 ⁹	<1x10 ²
Agar/MRSS (5% NaCl)	5	6.14	9.5x10 ⁸	2.2x10 ⁶
	10	6.23	9.5x10 ⁸	3.0x10 ⁵
	20	6.13	9.5x10 ⁸	5.1x10 ⁴
	30	6.23	9.5x10 ⁸	2.0x10 ²
	40	6.15	9.5x10 ⁸	<1x10 ²
	50	6.19	9.5x10 ⁸	<1x10 ²

TIEMPO (min)	Log (N/No)	
	Agar (100bar)	
	MRS	MRSS
5	-1.3881	-2.6353
10	-2.2224	-3.5006
20	-3.8653	-5.2701
30	-5.5228	-6.6766
40	-6.0636	>-6.977
50	>-7.041	>-6.977

ANEXO 2 CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO

1) IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO



a) EXTRACCIÓN DE DNA

Se colocaron 500μl de buffer TES en tubos eppendorf. Se tomó muestra con asa estéril aproximadamente del tamaño de un grano de arroz y se le adicionaron 20μl de lisozima. Se incubó a 37°C aproximadamente 15 min (máximo 60 min). Se adicionaron 8μl de pronasa y 8μl de rnasa. Se agitó en un vortex. Se dejó incubar a 65°C durante 1 hora. Se adicionaron 120μl de SDS (10%), se agitó y se puso en baño maría a 65°C durante 10 min. Se dejó enfriar. Se adicionó fenol-cloroformo (600μl), se agitó vigorosamente (se debe formar una emulsión blanca). Se centrifugó durante 10 min (en microcentrífuga a 500 rpm) se deben formar 3 capas. Se extrajo la primera capa (DNA) y se colocó en un eppendorf limpio. Se adicionó aproximadamente 1ml de etanol al 100% y se debe igualar volumen en el tubo. Se agitó suavemente. Se centrifugó en microcentrífuga (durante 10 min a 14000 rpm). Se retiró el líquido y se dejó solo el pellet en el tubo. El eppendorf se volteó y se dejó secar. Al día siguiente se adicionaron 50μl de agua destilada estéril, dejando hidratar y por último agitando en un vortex.

a) VISUALIZACION DEL ADN

El producto se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% (0.81g de agarosa se disuelven en 45 ml de solución TBE 1x). Se corrió el gel durante 60 min. a 70 v. El gel se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza en un transiluminador.

b) CUANTIFICACION DE ADN

Se utilizó un método espectrofotométrico. Se determinó absorbancia a 260 y 280 nm para determinar la relación de pureza. Se utilizó 1µl de muestra con 1µl de agua destilada y se determinó la absorbancia.

Lectura en espectro

Abs. 260 nm	50 ng/µl	Por DIL.	µL
0.011	0.55	220	22.72

c) REACCIÓN DE PCR

Después de determinar la concentración de ADN , esta se debe estandarizar a 50ng/µl, al realizar el PCR, se adicionaron sobre hielo a un tubo eppendorf de 0.5 ml los siguientes componentes:

BUFFER	10µl
Dntp (10mM)	5µl
Prim A (PA) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)	2µl
Prim B (3) (GTTGCGCTCGTTGCGGGACT)	1µl
Muestra Templado (DNA)	1µl
Taq (5U/µl)	2µl
MgCl (50mM)	23µl
H ₂ O destilada y estéril	56µl

El tubo se tapa, se centrifuga y se coloca en el termociclador (Perkin Elmer), donde se ejecutan los siguientes ciclos de amplificación:

Desnaturalización inicial	4 min.	94°C
35 ciclos de:		
Desnaturalización	45 min.	94°C
Alineamiento	55 min.	94°C
Extensión	72 min.	94°C
Extensión final	10 min.	72°C

d) VISUALIZACION DE PRODUCTOS DE PCR

El producto se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% (0.81g de agarosa se disuelven en 45 ml de solución TBE 1x). Se corrió el gel durante 60 min. a 70 v. El gel se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza en un transiluminador.

e) LIMPIEZA DE PRODUCTOS DE PCR

Se utilizó un kit comercial para la limpieza de los productos de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante:

Se agregaron 500µl de buffer PB, se agito el producto de PCR mezclando suavemente. El producto se transfirió a un tubo con columna y se centrifugo a 13000 rpm durante 1 min. Se descarto el sobrenadante (parte inferior del tubo columna). Se agregaron 750µl de buffer PE (adicionado previamente con etanol) y se centrifugo a 13000 rpm durante 1 min. Se tiro el sobrenadante y se repitió el centrifugado para asegurar que todo el buffer haya pasado por la columna. La columna se transfirió (parte superior del tubo columna) a un eppendorf de 1.5 ml (previamente cortada la asita) y se adicionaron 4.5µl de buffer EB. Se dejó reposar durante 1 min, para posteriormente centrifugar durante 1 min a 13000 rpm. Por último se removió la parte superior del tubo y se tapo el eppendorf para poderlo almacenar a -20°C.

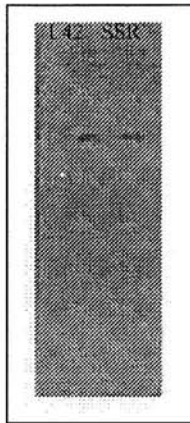


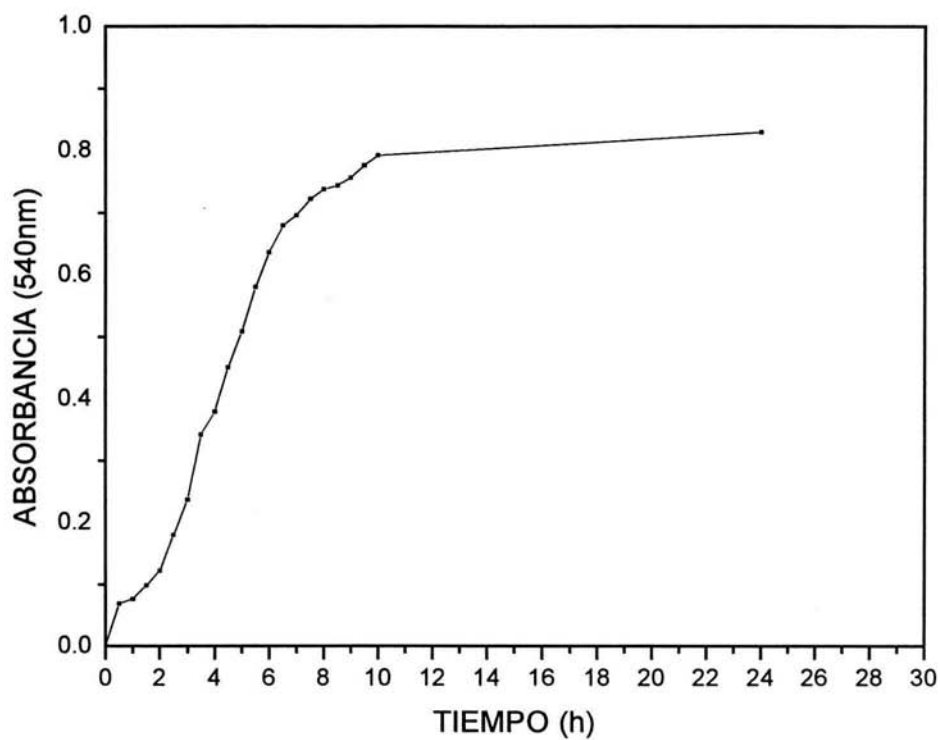
Figura 1. Visualización de productos de PCR

f) SECUENCIACION

La secuenciación se llevo a cabo mediante una comparación con secuencias depositadas en el GenBank utilizando el programa BLAST. Se utilizó el primer γ (ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG) para la elaboración del PCR. El microorganismo se identificó como *Leuconostoc citreum* con un 99% de similitud.

2) CURVA DE CRECIMIENTO DE *Leuconostoc citreum* (MEDIO MRS Y 37°C)

CURVA DE CRECIMIENTO DE *Leuconostoc citreum*



ANEXO 3 DIAGRAMAS DE TRABAJO

DIAGRAMA 1. DETERMINACIÓN DE LA CUENTA EN PLACA DE MICROORGANISMOS.

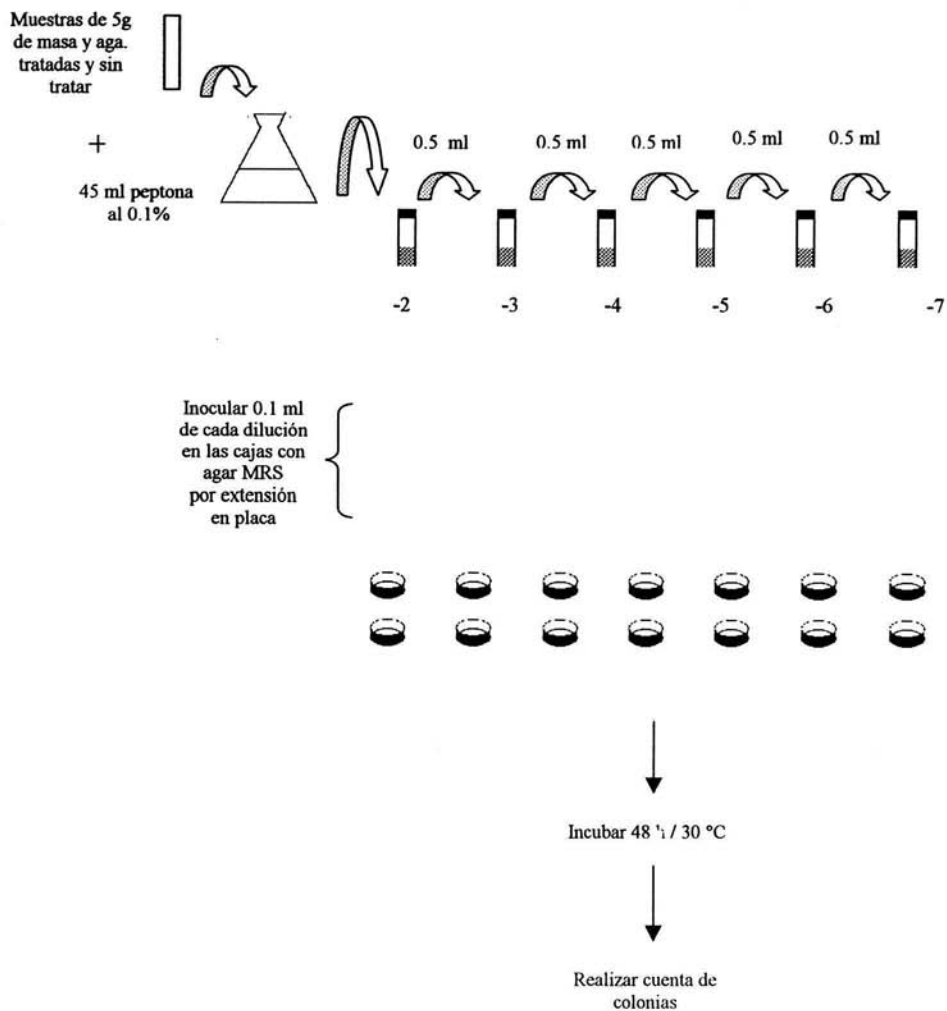


DIAGRAMA 2. APLICACION DE LA ALTA PRESION EN LAS MUESTRAS DE MASA

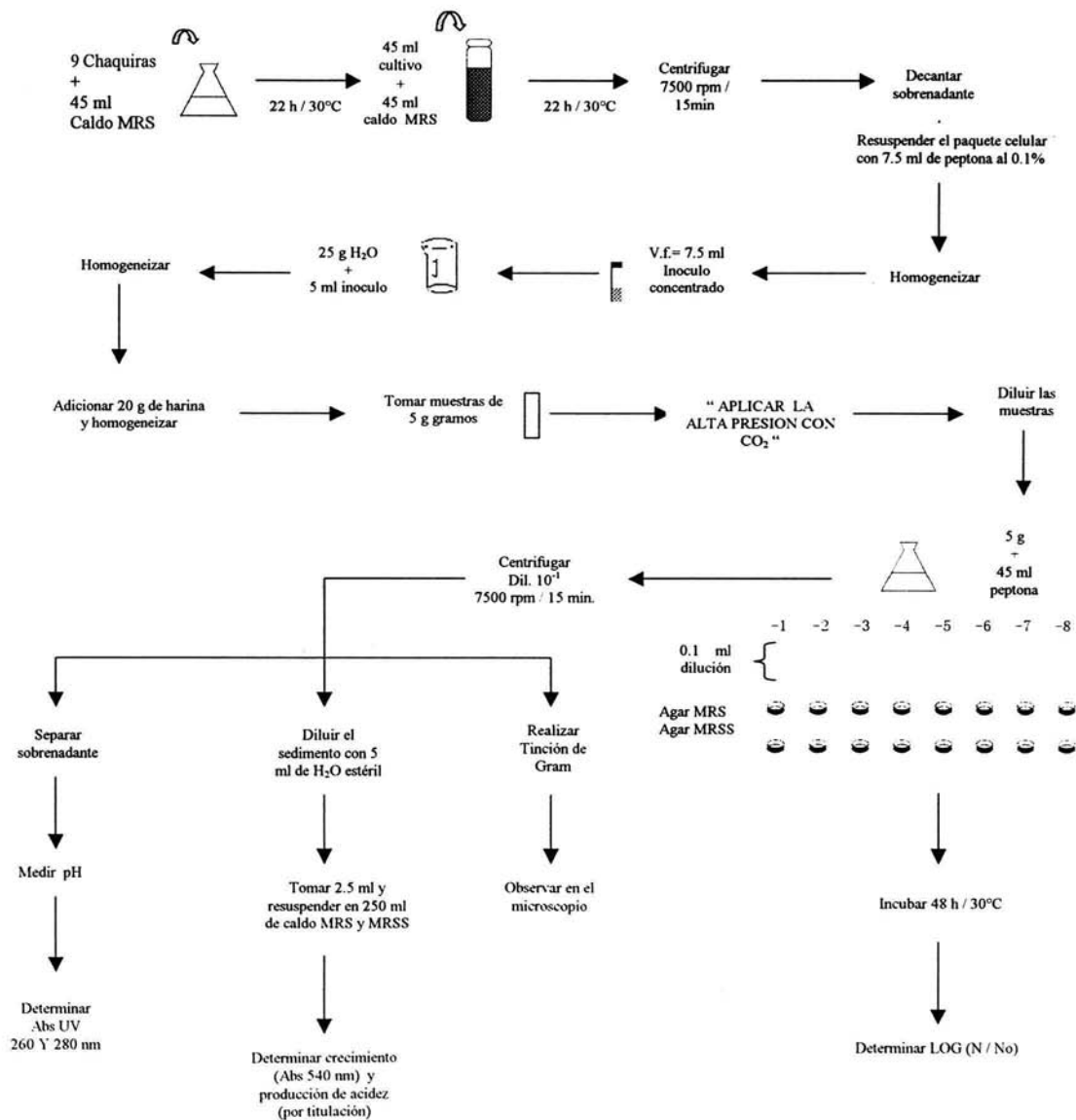


DIAGRAMA 3. APLICACION DE LA ALTA PRESION EN LAS MUESTRAS DE AGAR

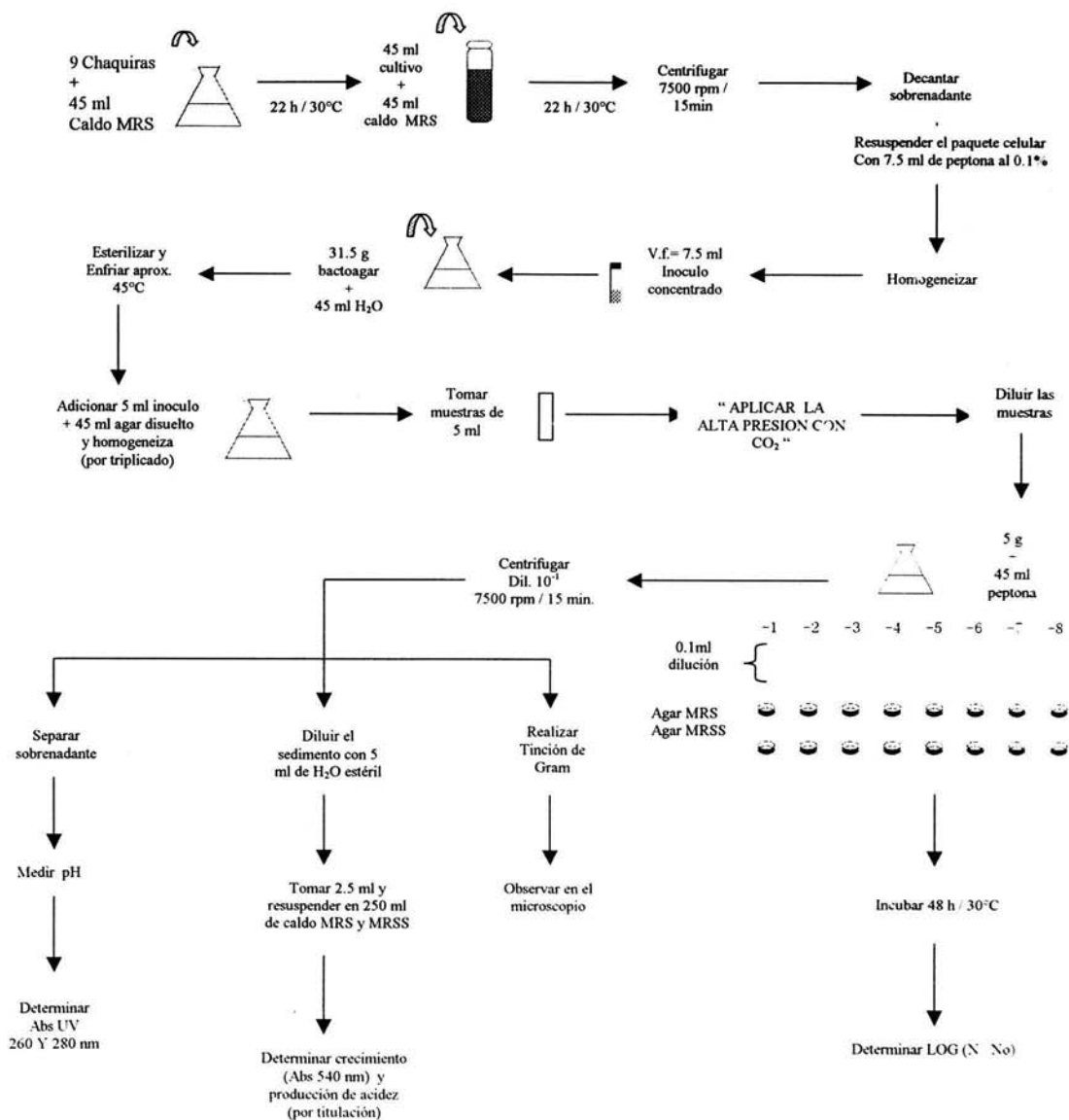
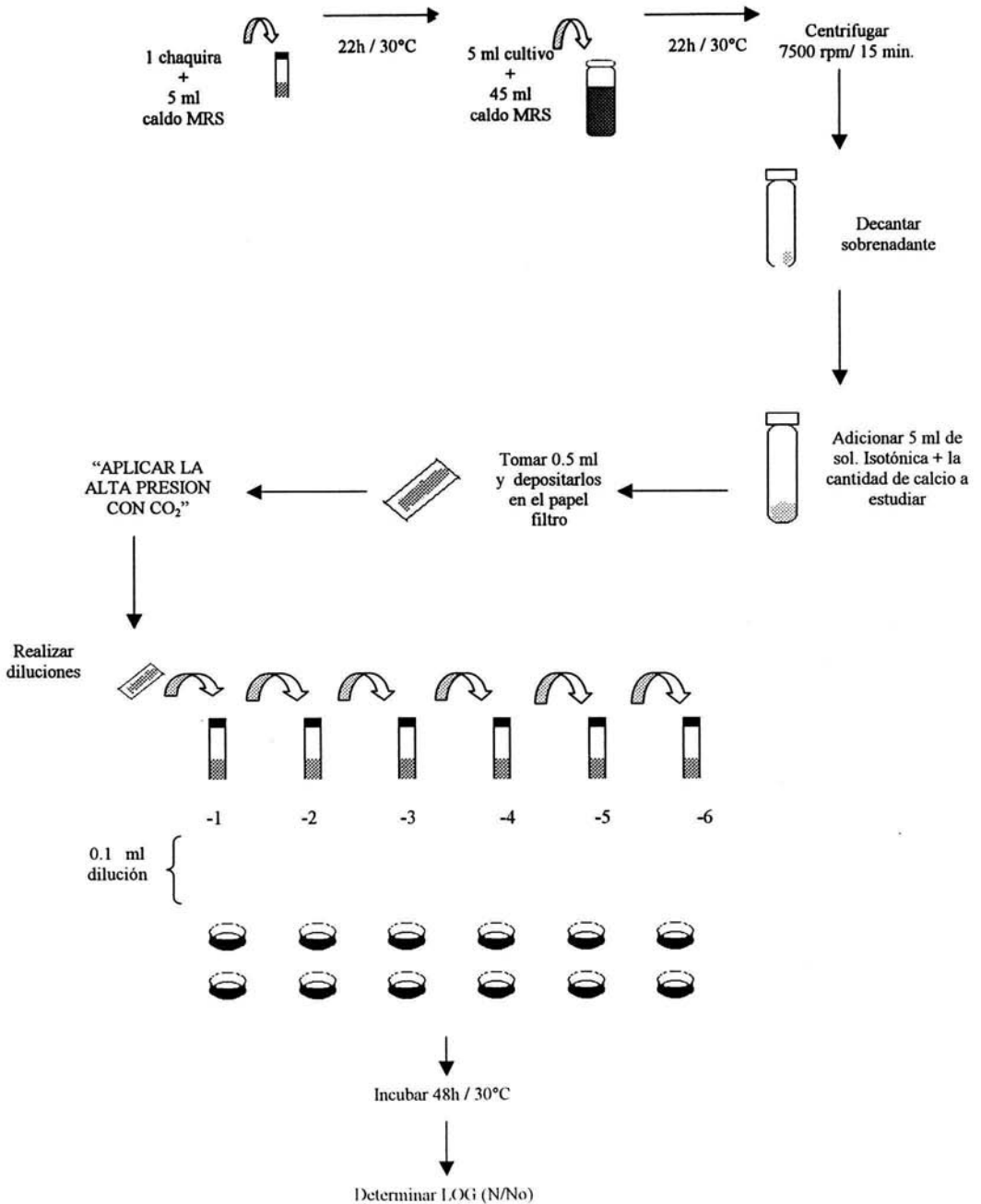


DIAGRAMA 4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL CALCIO



ANEXO 3

FIGURA 1. Barrido espectrofotometrico (220-300 nm). Obtenido para las muestras de masa

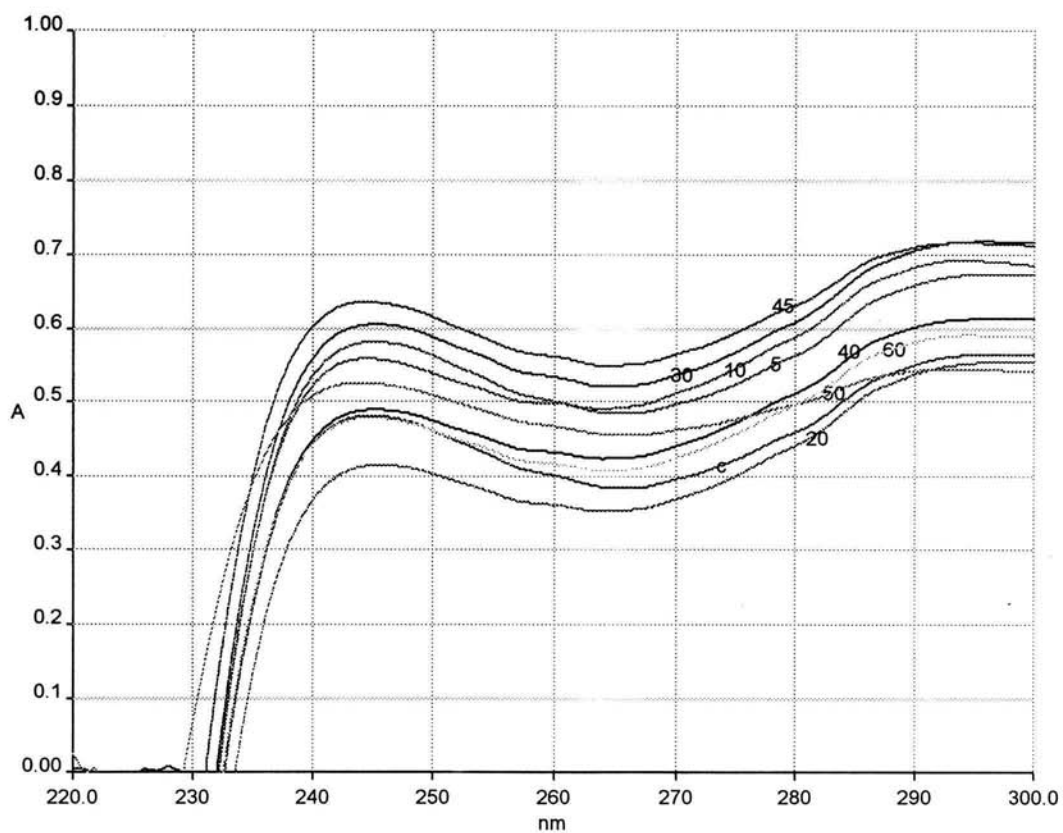


FIGURA 2. Barrido espectrofotometrico (220-300nm). Obtenido para las muestras de agar

