

ROJO, MARIA CECILIA

Determinacion de par

2014

73995



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

“Determinación de parámetros críticos y herramientas tecnológicas para la prevención y el control de la contaminación microbiana por levaduras osmófilas en jugos de uva concentrados”

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Microb.: María Cecilia ROJO

Noviembre 2014

Trabajo presentado por la microbióloga María Cecilia Rojo para optar al Título de Doctora en Ciencias Biológicas otorgado por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora:

Dra. Mariana COMBINA



Co-Directora:

Dra. Adriana TORRES

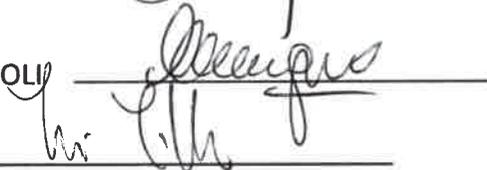


Aprobada por:

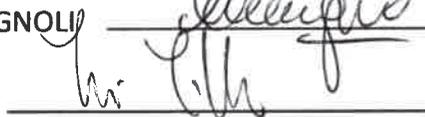
Dr. Carlos ZURITZ



Dra. Carina MAGNOLI



Dr. Iván CIKLIC



21 de noviembre de 2014

A Matías y al bebé que viene en camino...

A mi familia...

A esa energía divina que está presente conmigo en cada paso que doy y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi contención durante todo este período de estudio.

A mi compañero de vida, Matí, gracias por tanto amor, paciencia, templanza, comprensión. Juntos a la par siempre....

A mis padres, mis grandes maestros de la vida, gracias por dejarme estos valores y por permitirme soñar y apoyarme en cada uno de los pasos que di durante mi vida.

A mis hermanos por ser parte de mí, de este camino y por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado en este camino.

A mi directora de tesis, Mariana Combina, por ofrecerme sus valiosos conocimientos y experiencia profesional, por animarme y alentarme en cada una de las fases de la investigación. Gracias por tu enseñanza, paciencia, predisposición y dedicación.

A mi co-directora, Adriana Torres, por abrirme las puertas para resolver dudas y solucionar problemas que han surgido durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por el constante apoyo, asesoramiento y dedicación.

A cada uno de mis amigos y compañeros del INTA... Gracias por hacer de este camino, un camino de alegría y compañerismo, y por la ayuda y contención recibida en los momentos que necesité.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y a su cuerpo docente por todo lo brindado en mi formación de grado y posgrado.

A CONICET por otorgarme las becas que hicieron posible que se pueda llevar adelante este trabajo de investigación.

Título: Determinación de parámetros críticos y herramientas tecnológicas para la prevención y el control de la contaminación microbiológica por levaduras osmófilas de jugos de uva concentrados.

Palabras clave: Jugo de uva concentrado, *Zygosaccharomyces rouxii*, estabilidad microbiana, pasteurización, inhibidores químicos, puntos de contaminación.

Autor: Microbiól. ROJO, María Cecilia

Directora: Dra. Mariana Combina

Co-Directora: Dra. Adriana Torres

Resumen

El jugo de uva concentrado es un producto destinado al uso comercial (*commodity*) y por su carácter natural se utiliza para la elaboración de alimentos, como edulcorante de bebidas gaseosas y en la industria farmacéutica. Argentina se ha posicionado en los últimos años como una de las regiones más importantes a nivel mundial en lo que se refiere a la producción y exportación de uvas y sus derivados. Actualmente Mendoza produce el 51% y San Juan el 49% del jugo de uva concentrado nacional que se exporta a mercados como Estados Unidos, Japón y Canadá. Los rechazos por alteraciones microbianas en partidas exportadas, producen importantes pérdidas económicas y también dañan la imagen internacional del país. En estudios previos se ha demostrado que este sustrato puede estar contaminado por especies de levaduras osmófilas siendo *Zygosaccharomyces rouxii* la principal levadura alteradora de este producto. Sobre la base de lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes parámetros intrínsecos al sustrato como pH y concentración de azúcares, y factores extrínsecos como la temperatura sobre el desarrollo de esta levadura alteradora. Por otro lado se evaluaron tecnologías físicas y químicas para reducir la carga microbiana de los jugos concentrados y se tomaron diferentes puntos de muestreo en tres plantas elaboradoras para conocer las fuentes de la contaminación microbiana. En una primera etapa se determinaron los parámetros de crecimiento (velocidad máxima y fase lag) de diferentes cepas de *Z.rouxii* y se seleccionó la cepa MC9 que presentó mayor potencial alterador. Posteriormente se realizaron ensayos de estimación de vida útil en el sustrato natural ajustando los parámetros de pH y concentración de azúcar, a dos temperaturas, de almacenamiento y transporte. Los resultados mostraron que la disminución del pH produjo el mayor efecto para retardar el desarrollo de esta levadura y que un pH cercano a 2 aumenta la estabilidad microbiana del jugo de uva concentrado a más de 60 días. Se desarrollo un modelo predictivo que es de gran utilidad para la industria para estimar el crecimiento de la levadura en diferentes valores de concentración de azúcar y pH a temperaturas de almacenamiento y transporte. Por otro lado se realizaron ensayos de pasteurización con la cepa de *Z. rouxii* mas termo-resistente (MC8), proponiendo diferentes programas de pasteurización para alcanzar la esterilidad industrial de este producto. En cuanto a la evaluación de diferentes conservantes químicos sobre el crecimiento de *Z. rouxii*, ninguno de los conservantes químicos ensayados fue capaz de inhibir completamente el desarrollo de esta levadura, aunque algunos de ellos lograron una reducción del crecimiento del 40%. Con respecto a la determinación de los puntos de contaminación durante el proceso de elaboracion de los jugos concentrados no se observaron levaduras osmófilas en muestras de jugo de uva en etapas previas al proceso de preconcentrado y concentrado, pero si en etapas posteriores, incluso en jugo de uva concentrado pasteurizado. Se confirmó la presencia de levaduras osmófilas en distintas superficies de la planta elaboradora, que podrían representar puntos de contaminación del producto en las diferentes etapas de su elaboración.

Title: Determination of critical parameters and technological tools for prevention and control of concentrated grape juice contamination with osmophilic yeasts.

Keywords: Concentrated grape juice, *Zygosaccharomyces rouxii*, microbial stability, pasteurization, chemical preservatives, contamination sources.

Author: Microbiól. ROJO, María Cecilia

Director: Dra. Mariana Combina

Co-Director: Dra. Adriana Torres

Abstract

Concentrated grape juice is a commodity and due to its natural character, it is used for food production, as a sweetener in soft drinks and pharmaceutical industry. In recent years, Argentina has become one of the most important regions in the world regarding the production and export of grapes and their derivatives. Currently Mendoza produces 51% and San Juan 49% of the national concentrated grape juice is exported to markets like the U.S.A, Japan and Canada. Rejections by alterations in microbial exported goods, cause significant economic losses and negatively affects the country's international image. Previous studies have shown that this substrate may be contaminated by osmophilic yeasts species with *Zygosaccharomyces rouxii* as the most prominent among them. Based on these facts, the aim of this study was to evaluate different intrinsic parameters such as pH and substrate concentration of sugars, and extrinsic factors such as temperature on the development of this spoilage yeast. Furthermore physical and chemical technologies were evaluated to reduce the microbial population of the concentrated grape juice, and the source of microbial contamination was determined by sampling different places within the processing plants. In the first phase of growth parameters (maximum growth rate and lag phase) of different strains were determined *Z.rouxii* and MC9 strain with greater disruptive potential (high growth rate and lower latency phase) was selected. Subsequently, stability microbial estimations were performed in concentrated grape juice by adjusting the parameters of pH and sugar concentration, at two temperatures, storage and shipping. From these results it was concluded that the pH is the parameter that exerts greater effect on the development of this yeast and around pH 2 microbial stability extends beyond 60 days. In this paper a predictive model that would be useful for the industry to evaluate the behavior of yeast to different values of pH and sugar concentration. On the other phase pasteurization assays were conducted with the strain *Z. rouxii* being this more heat resistant (MC8), showing that, with different pasteurization programs can be applied we can achieve absolute thermal death of this yeast. As for the evaluation of different chemical preservatives on the growth of *Z. rouxii*, none of the tested chemical preservatives were able to completely inhibit the growth of this yeast, although some of them achieved a reduction of 40% growth. According to the determination of the lack of contamination points osmophilic yeast was observed in grape juice samples in prior to the pre-concentrated and concentrated stages, but at later stages, even in concentrated grape juice pasteurized. We can also confirm the presence of osmophilic yeast in different surfaces of the processing plant associated with the stages of pre-concentrated and concentrated grape juice, which would constitute a reservoir of these yeasts representing a point of re-contamination of the product already developed.

Índice de contenidos

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
Capítulo I: Introducción General	15
I.1. Los microorganismos y los alimentos	15
I.2. pH	16
I.3. Actividad de agua (a_w)	19
I.4. Potencial Oxido-Reducción	20
I.5. Disponibilidad de nutrientes	22
I.6. Temperatura	23
I.7. Definición de jugo de uva concentrado	24
I.7.1. Etapas para la elaboración de jugos de uva concentrados	25
I.8. Aplicaciones e importancia del jugo de uva concentrado	28
I.9. Levaduras	31
I.9.1. Generalidades	31
I.9.2 Taxonomía e Identificación de levaduras	35
I.9.3. Levaduras en alimentos	38
I.9.4. Importancia de las levaduras en jugos de uva concentrados	38
I.9.5. Levaduras osmófilas: <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	40
I.10. Mecanismos de osmotolerancia de levaduras osmófilas	41
I.11. Microbiología Predictiva	42
I.11.1. Modelo secundario de superficie de respuesta	45
I.11.2. Fases de desarrollo del modelo de superficie de respuesta	46
I.12. Tecnologías físicas y químicas para la conservación de jugos de uva concentrados	49
I.12.1. Pasteurización	49
I.12.1.1. Termo-resistencia	50
I.12.1.2. Termo-resistencia en levaduras	52
I.12.1.3. Modelos predictivos en procesos de inactivación térmica	53
I.12.2. Conservantes químicos	55
I.13. Gestión de la calidad e inocuidad de los alimentos	58

I.13.1 Análisis de Riesgo. Puntos críticos de control (HACCP)	59
I.14. Fundamento de la Investigación	61
I.15. Objetivo general	62
Capítulo II: Aislamiento, identificación y caracterización de levaduras osmófilas de jugos de uvas concentrados de Argentina	63
II.1. Hipótesis	63
II.2. Objetivos específicos	63
II.3. Materiales y Métodos	64
II.4. Resultados y Discusión	67
II.5. Conclusiones de este capítulo	72
Capítulo III: Efecto del pH y la concentración de azúcar sobre el crecimiento de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> en jugos de uva concentrados mantenidos temperatura de almacenamiento y transporte	73
III.1. Hipótesis	73
III.2. Objetivos específicos	73
III.3. Materiales y Métodos	74
III.4. Resultados y Discusión	78
III.5. Conclusiones de este capítulo	90
Capítulo IV: Evaluación de tratamientos térmicos para reducir la población de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> en jugos de uva concentrados	91
IV.1. Hipótesis	91
IV.2. Objetivos específicos	91
IV.3. Materiales y Métodos	92
IV.4. Resultados y Discusión	95
IV.5. Conclusiones de este capítulo	106
Capítulo V: Evaluación de diferentes conservantes químicos para controlar el crecimiento de <i>Z. rouxii</i> en un medio de cultivo con alta concentración de azúcares	107
V.1. Hipótesis	107
V.2. Objetivos específicos	107
V.3. Materiales y Métodos	108
V.4. Resultados y Discusión	112

V.5. Conclusiones de este capítulo	124
Capítulo VI: Evaluación de la incidencia de levaduras osmófilas en diferentes plantas concentradoras de jugo de uva de las provincias de Mendoza y San Juan	125
VI.1. Hipótesis	125
VI.2. Objetivos específicos	125
VI.3. Materiales y Métodos	126
VI.4. Resultados y Discusión	128
VI.5. Conclusiones de este capítulo	134
Capítulo VII: Conclusión final y proyecciones	135
Capítulo VIII: Bibliografía	137

Índice de tablas

Capítulo I: Introducción General

Tabla I.1: Valores de actividad de agua aproximados para algunos alimentos	20
Tabla I.2: Clasificación taxonómica de los géneros de levaduras comúnmente presentes en uva y vino	37
Tabla I.3: Coeficientes de regresión estimados para el efecto lineal y cuadrático de las variables temperatura y tiempo, y el efecto de la interacción entre ambas variables sobre la respuesta microbiana con sus respectivas desviaciones estándares	47

Capítulo II: Aislamiento, identificación y caracterización de levaduras osmófilas de jugos de uvas concentrados de Argentina

Tabla II.1: Coeficientes de regresión estimados para el efecto lineal y cuadrático de las variables temperatura y tiempo, y el efecto de la interacción entre ambas variables sobre la respuesta microbiana con sus respectivas desviaciones estándares	68
Tabla II.2: Parámetros de crecimiento y coeficientes de regresión de ajuste al modelo para valores experimentales obtenidos por densidad óptica y por recuento de células viables en medio de cultivo MYGF	69
Tabla II.3: Parámetros de crecimiento y coeficientes de regresión de ajuste para valores experimentales obtenidos por recuento de células viables de 3 cepas de <i>Z. rouxii</i> en jugo de uva concentrado a 68 °Brix pH 3,7.	71

Capítulo III: Efecto del pH y la concentración de azúcar sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* en jugos de uva concentrados mantenidos temperatura de almacenamiento y transporte

Tabla III.1: Diferentes tratamientos (combinaciones de pH y °Brix) contemplados en el diseño experimental en condiciones de temperatura constante y variable	75
Tabla III.2: Parámetros de crecimiento de <i>Z. rouxii</i> MC9 (μ_{max} , velocidad máxima de crecimiento; λ , duración de la fase de latencia) obtenidas en condiciones de temperatura constante (23°C) para diferentes tratamientos	79
Tabla III.3: Coeficientes de regresión estimados por análisis ANOVA para parámetros de crecimiento (μ_{max} and λ) de <i>Z. rouxii</i> MC9 en condiciones de	80

temperatura constante (23°C)

Tabla III.4: Tiempo para producir alteración (TPA) por *Z. rouxii* MC9 en jugo de uva concentrado a temperatura constante y variable para diferentes (combinaciones de pH y °Brix) contemplados en el diseño experimental 83

Tabla III.5: Coeficientes de regresión estimados por análisis de ANOVA para tiempo para producir alteración (TPA) por *Z. rouxii* MC9 en jugo de uva concentrado a temperatura constante (C, 23°C) y variable (V) 84

Capítulo IV: Evaluación de tratamientos térmicos para reducir la población de *Zygosaccharomyces rouxii* en jugos de uva concentrados

Tabla IV.1: Parámetros de termo-resistencia de distintas cepas de *Z. rouxii* obtenidos a 60 °C en jugos de uva concentrados a 68 °B y pH 3,2 96

Tabla IV.2: Parámetros de termo-resistencia obtenidos a distintas temperaturas de la cepa MC8 de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados a 68 °Brix y pH 3,2 según el modelo bifásico 98

Tabla IV.3: Parámetros de termo-resistencia obtenidos a distintas temperaturas de la cepa MC8 de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados a 68 °B y pH 3,2 según el modelo de Doble Weibull Simplificado. 100

Tabla IV.4: Programas de pasteurización sugeridos a la industria del jugo de uva concentrado para lograr la esterilidad industrial 103

Capítulo V: Evaluación de diferentes conservantes químicos para controlar el crecimiento de *Z. rouxii* en un medio de cultivo con alta concentración de azúcares

Tabla V.1: Rangos de concentración de los conservantes químicos evaluados 109

Tabla V.2: Parámetros A (reducción máxima de crecimiento de la levadura), μ (tasa máxima de cambio) y λ (concentración el conservante por encima de la cual se inicia la reducción del crecimiento) obtenido a partir de la ecuación de Gompertz reparametrizada para los distintos conservantes químicos ensayados. 114

Tabla V.3: Ecuaciones predictivas para la reducción de crecimiento de *Z. rouxii* en función de la concentración de conservante. Los parámetros estimados de la ecuación se calcularon como valores medios obtenidos a partir de tres experimentos 115

Capítulo VI: Evaluación de la incidencia de levaduras osmófilas en diferentes plantas concentradoras de jugo de uva de las provincias de Mendoza y San Juan

Tabla V.1: Muestras tomadas en las distintas etapas de la elaboración de jugo de uva concentrado en distintas plantas concentradoras de Mendoza y San Juan 127

Tabla V.2: Hisopados de superficies de distintas plantas concentradoras de jugos de uva 128

Tabla V.3: Recuentos de levaduras osmófilas en distintas muestras durante la concentración de jugo de uva en diferentes empresas 129

Tabla V.4: Recuentos de levaduras osmófilas obtenidas de hisopados de distintas superficies durante el procesamiento de jugo de uva en diferentes empresas 129

Tabla V.5: Recuentos de levaduras osmófilas de distintas muestras de jugos de uva pre-concentrado de la planta C 132

Índice de Figuras

Capítulo I: Introducción General

Figura I.1: Esquema del Proceso de elaboración del jugo de uva concentrado	27
Figura I.2: Áreas vitivinícolas en las dos principales provincias productoras de jugo de uva concentrado	29
Figura I.3: Observación microscópica de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	32
Figura I.4: Colonias de la levadura <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	33
Figura I.5: Porcentaje de levaduras osmófilas y osmotolerantes en jugos de uva concentrados de Argentina	39
Figura I.6: Ejemplo de un diagrama de Pareto que indica que efecto lineal del pH es el que ejerce una mayor influencia sobre el crecimiento microbiano	48

Capítulo II: Aislamiento, identificación y caracterización de levaduras osmófilas de jugos de uvas concentrados de Argentina

Figura II.1: Poblaciones de diferentes cepas de <i>Z.rouxii</i> en jugo de uva concentrado a 68 °B y pH 3,7 seguidas por densidad optica y recuento de células viables	70
--	----

Capítulo III: Efecto del pH y la concentración de azúcar sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* en jugos de uva concentrados mantenidos temperatura de almacenamiento y transporte

Figura III.1: Perfiles de temperatura (interna y externa) registradas durante el experimento que reproduce la temperatura durante la exportación del jugo de uva concentrado desde el Hemisferio Sur al Hemisferio Norte	77
Figura III.2: Gráficos de superficie de respuesta, diagramas de Pareto estandarizado y coeficientes de regresión para la fase de latencia y μ_{max} de <i>Z. rouxii</i> MC9 en función del pH y °Brix a 23°C en jugos de uva concentrados	82
Figura III.3: Gráficos de superficie de respuesta, diagramas de Pareto estandarizado y coeficientes de regresión para el tiempo necesario para producir alteración de <i>Z.rouxii</i> MC9 en función del pH y °Brix en jugos de uva concentrados en condiciones de temperatura variable y constante, respectivamente	86

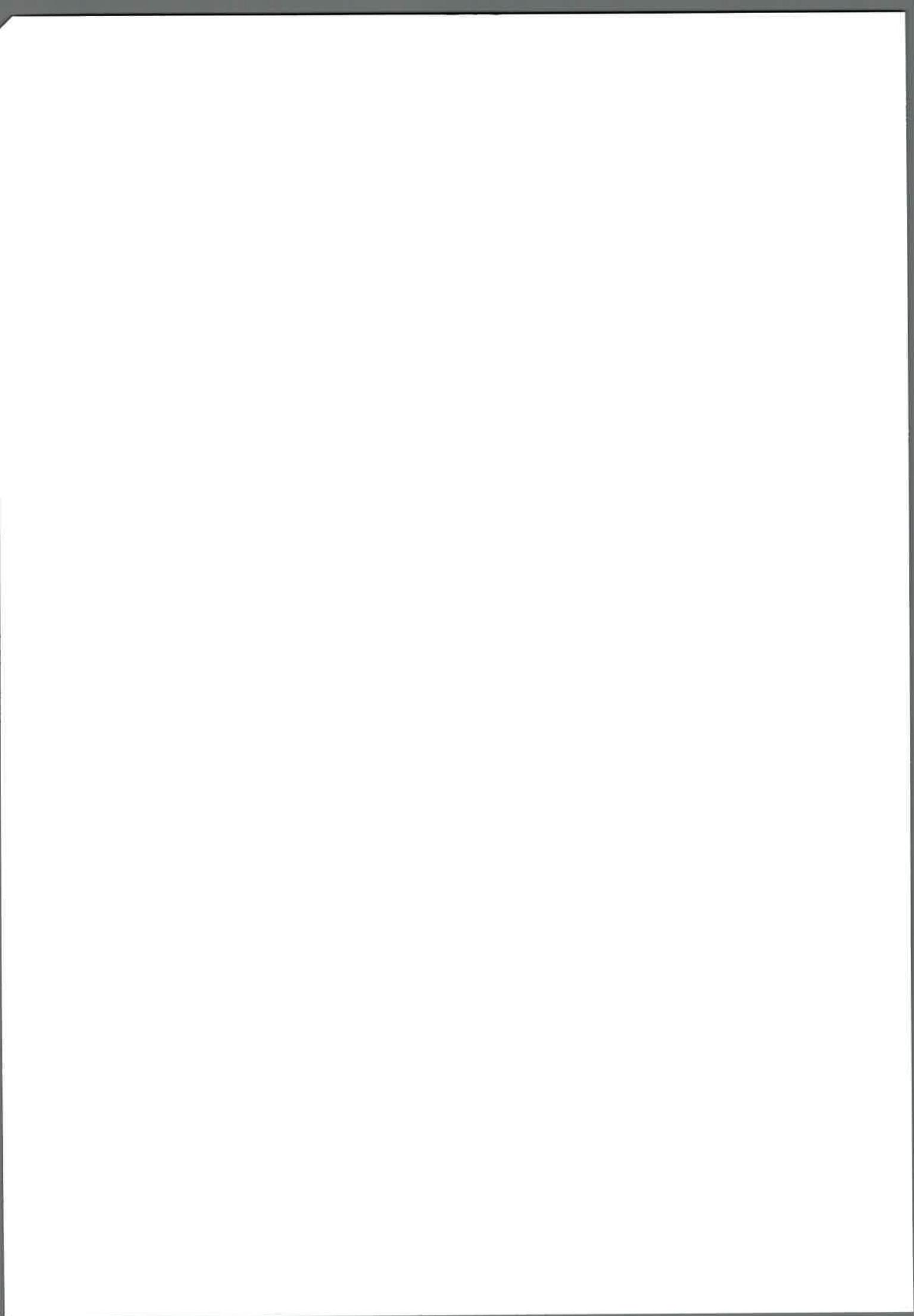
Capítulo IV: Evaluación de tratamientos térmicos para reducir la población de *Zygosaccharomyces rouxii* en jugos de uva concentrados

- Figura IV.1: Curvas de supervivencia de distintas cepas de *Z. rouxii* a 60°C en jugos de uva concentrados a 68 °Brix y pH 3,2 96
- Figura IV.2: Curvas de supervivencia de la cepa *Z. rouxii* MC8 en jugo de uva concentrado 68 °Brix y pH 3,2 obtenidas por ajuste de datos experimentales al modelo bifásico 97
- Figura IV.3: Curvas de supervivencia de la cepa *Z. rouxii* MC8 en jugo de uva concentrado 68 °Brix y pH 3,2 obtenidas por ajuste de datos experimentales al modelo Doble Weibull Simplificado 99
- Figura IV.4: Curva de supervivencia de células bacterianas basada en el Modelo Doble Weibull Simplificado 100
- Figura IV.5: Curva que relaciona los valores de $b(t)$ con las temperaturas evaluadas según el modelo secundario Log logístico 104

Capítulo V: Evaluación de diferentes conservantes químicos para controlar el crecimiento de *Z. rouxii* en un medio de cultivo con alta concentración de azúcares

- Figura V.1: Espectrofotómetro Bioscreen C 110
- Figura V.2: Ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Gompertz reparametrizada para la reducción del crecimiento (Gr) que se deducen de las áreas fraccionales obtenidas para distintas concentraciones el sorbato potásico y de benzoato sódico 113
- Figura V.3: Expresión gráfica de las ecuaciones matemáticas obtenidas a partir de tres experimentos para la estimación de la reducción de crecimiento en función de la concentración de diferentes conservantes 116
- Figura V.4: Análisis de ANOVA y representación gráfica de la reducción del crecimiento máximo (Gr) obtenido para *Z. rouxii* en función de los diferentes conservantes 117

Capítulo I: Introducción



I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Los microorganismos y los alimentos

Las interacciones que se producen entre los microorganismos por una parte, y con las plantas y los animales por otra, son naturales y constantes. En la naturaleza, está perfectamente comprobado el papel ecológico de los microorganismos y su importancia en todos los ciclos geoquímicos. Los alimentos que consume el hombre proceden básicamente de las plantas y de los animales o de productos derivados de los mismos, por lo que resulta comprensible que dichos alimentos puedan contener microorganismos que interactúen con ellos (Frazier y Westhoff, 1993).

En la mayoría de los casos, los microorganismos utilizan nuestros alimentos como fuente de nutrientes para su propio crecimiento, hecho que, naturalmente, puede ocasionar su alteración. Los microorganismos pueden deteriorar un alimento porque se multiplican en él, utilizan nutrientes, producen modificaciones enzimáticas, y le transfieren sabores y aromas desagradables mediante la degradación de determinadas sustancias o mediante la síntesis de nuevos compuestos. La alteración de los alimentos es consecuencia lógica de la actividad de los microorganismos, ya que, en la naturaleza, una de sus funciones es la reconversión de las formas reducidas de carbono, nitrógeno y azufre existentes en las plantas y en los animales muertos, en otras formas oxidadas que necesitan las plantas, las cuales, a su vez, son consumidas por los animales. Por lo tanto, los microorganismos simplemente “desempeñando su función” en la naturaleza, muchas veces pueden convertir en no aptos para el consumo a nuestros alimentos y/o sus derivados (Mossel e Ingram, 1955; Jay, 1978).

Para evitar esto, reducimos al mínimo el contacto entre los microorganismos y nuestros alimentos (prevención de la contaminación) y también eliminamos los microorganismos que contienen, o por lo menos adaptamos las condiciones de su almacenamiento para evitar que se multipliquen (conservación) (Frazier y Westhoff, 1993).

A veces, las interacciones entre los microorganismos y nuestros alimentos son beneficiosas, tal como se observa en algunos productos, los cuales, una vez fermentados, adquieren un sabor más agradable. ¿Cuáles son los factores que regulan estas interacciones? ¿Por qué razón algunas veces esta interacción es beneficiosa,

mientras que otras veces no lo es? ¿Por qué algunos alimentos son más resistentes a la alteración microbiana? El alimento es el sustrato y, por ello, es importante tener en cuenta las características del mismo. También tienen importancia tanto el tipo de microorganismos como las condiciones ambientales. No obstante, el alimento, o sustrato, es el que determina cuáles microorganismos son capaces de crecer. En microbiología de los alimentos, el conocimiento básico de los factores que favorecen o inhiben la multiplicación de los microorganismos es esencial para el control de microorganismos alteradores y es útil para el estudio de la estabilidad microbiana de los alimentos (Jay, 1978). En principio, los factores físicos, químicos y biológicos, se estudian de manera individual, y luego sus interacciones. Los principales factores de la composición de todo alimento que influyen en la actividad microbiana son: el pH, la actividad de agua (a_w), el potencial de óxido-reducción, los nutrientes, y la presencia de sustancias inhibitoras (Grant, 2004).

I.2. pH

La concentración de iones de hidrógeno está representada en la definición de pH de la forma que sigue:

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+] \quad \text{ó} \quad \text{pH} = \log_{10} (1/ [\text{H}^+]) \quad (1)$$

Así pues, el pH es el logaritmo negativo de la concentración de protones o iones hidrógeno. En alimentos, las sustancias ácidas que interesan son casi siempre ácidos débiles (HA) que se disocian dando lugar a H^+ y A^- . En equilibrio la relación entre $[\text{H}^+]$, $[\text{A}^-]$ y $[\text{HA}]$ es una constante (K_a), siendo

$$K_a = [\text{H}^+] [\text{A}^-]/[\text{HA}] \quad (2)$$

El pH influye en la velocidad de la multiplicación de los microorganismos, y también en la cantidad que sobreviven en los alimentos durante su almacenamiento, tratamiento térmico, desecación, o durante cualquier otro tipo de tratamiento. Asimismo, es posible que el pH inicial del alimento resulte favorable para el desarrollo de un determinado microorganismo, pero como consecuencia de la existencia de microbiota competitiva o de la multiplicación del propio microorganismo, el pH se puede volver desfavorable. Por el contrario, es posible que el pH inicial sea limitante para el crecimiento

microbiano, y que la multiplicación de un reducido número de microorganismos modifique el pH hasta que alcance un valor más apropiado para que crezcan otros microorganismos (Frazier y Westhoff, 1993).

Cada microorganismo presenta un rango de pH para su desarrollo, con un pH óptimo donde se obtiene la velocidad máxima de crecimiento. El pH afecta de forma importante a las células microbianas presentes de los alimentos. En general, las levaduras y los hongos filamentosos toleran mejor la acidez que las bacterias. El pH intrínseco de los alimentos es diferente en cada uno de ellos, aunque la mayoría tienen un pH neutro o ácido. Los alimentos cuyo pH es bajo (valores inferiores a 4,5) no son alterados fácilmente por las bacterias, siendo más sensibles a la alteración por levaduras y hongos filamentosos. Desde el punto de vista microbiológico, todo alimento que tenga un pH bajo tendería por ello a ser más estable, que un alimento neutro (Corlett y Brown, 1980; Frazier y Westhoff, 1993).

El pH es un factor básico para la preservación de los alimentos, afectando la conformación de las proteínas, la síntesis enzimática y los productos finales del metabolismo. El crecimiento y la supervivencia de los microorganismos están fuertemente influenciados por el pH y el contenido de ácidos orgánicos en el alimento. Como se mencionó anteriormente, las bacterias en general requieren un rango de pH externo entre 4 y 9 para poder crecer, mientras que los hongos filamentosos y las levaduras exhiben mayor tolerancia, pudiendo desarrollarse en los rangos de pH externo de 1.5–11 y 1.5–8, respectivamente (Alzamora, 1997; Martorell y col., 2007; Fleet, 2011).

Los microorganismos necesitan mantener su pH intracelular (pH_i) dentro de un rango estrecho y cercano a la neutralidad para poder crecer. Este valor óptimo de pH depende de la especie: los hongos y levaduras acidófilas tienen un pH_i comprendidos entre 4,5 - 6; las neutrófilas entre 7,5–8 y las alcalófilas, entre 8,4–9. Los organismos tienen distintas estrategias para regular su pH, y por lo tanto, distinta tolerancia a los cambios del pH externo. Los microorganismos que son más resistentes a valores bajos de pH, como hongos y levaduras, poseen también menores valores de pH_i , lo que indicaría una estrategia muy efectiva de adaptación al medio ácido (Booth y Kroll, 1989).

Existen tres formas en que se puede modificar el pH para que actúe como factor de conservación (Corlett y Brown, 1980; Brown y Booth, 1991) aunque aún no se conoce exactamente el mecanismo por el cual los microorganismos interactúan con el pH. Estas formas son:

- Vía ácidos fuertes: estos compuestos disminuyen el pH externo, pero son impermeables a las membranas celulares y ejercerían su acción alterando la conformación y la actividad de una o más enzimas esenciales presentes en la capa externa de las células, y por lo tanto, disminuyendo la efectividad de los sistemas de transporte de iones y nutrientes. Estos compuestos producen pH extremadamente bajos para un alimento, además tales niveles de acidez son generalmente inaceptables en alimentos y sólo permisibles en bebidas carbónicas, en las que se emplea ácido fosfórico como acidulante.
- Vía ácidos débiles: las formas no disociadas de estos ácidos débiles, son permeables a través de las membranas y actúan como transportadores de protones, ionizándose en el citoplasma y acidificando el medio interno. El efecto primario es disminuir el pH_i , pero además, el anión del ácido no disociado puede tener efectos inhibitorios específicos en el metabolismo, incrementando el efecto del pH.
- Vía iones-ácido potenciados: la disminución del pH potencia la actividad de compuestos tales como bicarbonato, sulfito y nitrito, incrementando la acción antimicrobiana de los mismos; es decir que el efecto del pH es indirecto.

Las bases fisiológicas del efecto del pH sobre el metabolismo de las levaduras aún no se entiende completamente. En general, se cree que el mantenimiento de un gradiente de protones a través de la membrana plasmática ayuda a mantener el pH intracelular constante alrededor de 6,5 que es de vital importancia para la actividad óptima de los procesos metabólicos de la célula, y resulta crítico para la supervivencia de la levadura (Holyoak y col., 1996; Macpherson y col., 2005).

El pH y la acidez interactúan sinérgicamente con muchos otros factores que afectan el desarrollo de levaduras, tales como la temperatura, la concentración de azúcares, a_w , etc,

y este es un concepto de gran importancia que determina la estabilidad del producto y su vida útil (Battey y col., 2002; Evans y col., 2004).

I.3. Actividad de agua (a_w)

El agua es un requerimiento esencial para la vida. En microbiología de los alimentos, la mejor forma de medir la disponibilidad de agua en un alimento es mediante la actividad de agua (a_w). La a_w en un alimento o en una solución se define por la relación entre la presión de agua del alimento (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura:

$$a_w = p/p_0 \quad (3)$$

A medida que una solución se concentra, la presión de vapor disminuye y la a_w va descendiendo a partir de un valor máximo de 1 para el agua pura (Grant, 2004). Los alimentos con baja a_w pueden ser de dos tipos: alimentos curados cuya actividad de agua se reduce por la presencia o adición de un soluto como sal o azúcar, y los alimentos que son deshidratados mediante la eliminación de agua mediante secado por congelación o evaporación simple (Houtsma y col. 1996).

La a_w es uno de los factores ecológicos más importantes que afectan el crecimiento de las levaduras y otros microorganismos en los alimentos. La mayoría de las levaduras son tolerantes a valores de a_w reducidos. En general, las levaduras responsables de la alteración de ciertos alimentos se desarrollan a valores de a_w de 0,90-0,95. Sin embargo, varias especies de levaduras pueden crecer a valores de a_w de 0,62. Este grupo de levaduras han sido referidas como levaduras osmófilas o xerófilas (Tilbury, 1980a, b). La tabla 1 muestra los valores de a_w para determinados tipos de alimentos.

Cuando la actividad de agua del medio externo se reduce, los microorganismos, tienden rápidamente a alcanzar el equilibrio osmótico con el medio que los rodea, principalmente a través de la pérdida de agua. Cuando el descenso es muy drástico se produce plasmólisis de la célula con pérdida de turgencia de la membrana y su muerte. Cuando el descenso es gradual, la célula inmediatamente pone en marcha un mecanismo osmoregulador que le permite recuperar el agua perdida y mantener la homeostasis con respecto de su contenido de agua. Se produce la acumulación intracelular de solutos

“compatibles” por síntesis y/o por transporte activo desde el medio extracelular hasta balancear la osmolalidad externa (Gould, 1995; Grant, 2004).

Tabla I.1. Valores de actividad de agua aproximados para algunos alimentos (Adaptado de Brewer, 1999)

Valores de a_w	Alimentos
1,00–0,95	carne fresca, fruta fresca y en conserva, verduras, huevos.
0,95–0,90	queso fundido, productos de panadería, jamón crudo, salchicha seca, cerdo con alto contenido de sal, jugo de naranja concentrado.
0,90–0,80	quesos duros, leche condensada azucarada, mermeladas, margarina, jamón, pan blanco.
0,80–0,70	jugos de frutas concentrados, melaza, jarabe, pescado
0,70–0,60	Queso parmesano, frutos secos, jarabe de maíz, copos de avena.
0,60–0,50	chocolate, miel.
0,40	huevo desecado, cacao.
0,30	papas fritas, galletas saladas.
0,20	leche en polvo, legumbres secas.

El modo de acción de estos solutos “compatibles” no solo se explica por su papel de osmolitos, sino que se cree que tienen una propiedad fundamental: estabilizar la estructura proteica (y por lo tanto sus funciones) preservando las funciones de la capa de hidratación (Leistner y Russell, 1991). En las levaduras y hongos filamentosos los solutos compatibles de mayor importancia son los polioles como manitol, arabitol, sorbitol y glicerol, entre los más importantes. Las diferencias en la capacidad de biosíntesis o de mecanismos de transporte de cada microorganismo determinan los valores de a_w límite para el crecimiento de varios géneros y especies.

I.4. Potencial oxido-reducción (O-R)

Tanto la tensión de oxígeno o presión parcial de oxígeno en torno a un alimento como el potencial de óxido-reducción (O-R), o poder oxidante y reductor del propio alimento,

influyen en el tipo de microorganismos que crecerán en él y, por lo tanto, en las modificaciones que tendrán lugar en el mismo. El potencial de O-R de un alimento está definido (1) por el potencial de O-R típico del alimento, (2) por la capacidad de compensación del alimento, es decir, por su resistencia a modificar su potencial, (3) por la presión de oxígeno de la atmósfera existente en torno al alimento, y (4) por la comunicación que la atmósfera tiene con el alimento. El aire tiene una elevada tensión de oxígeno, pero el espacio de cabeza de una lata de un alimento que se ha conservado sometiéndola al vacío tendría una tensión de oxígeno baja (Brown y Emberger, 1980).

Desde el punto de vista de su capacidad para utilizar el oxígeno libre, los microorganismos se han clasificado en aerobios cuando necesitan oxígeno libre, anaerobios cuando crecen mejor en ausencia de oxígeno libre, y facultativos cuando crecen bien tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Los hongos filamentosos y la mayoría de las levaduras crecen mejor en aerobiosis, mientras que las bacterias de las diferentes especies pueden ser aerobias, anaerobias o facultativas (Frazier y Westhoff, 1993).

Desde el punto de vista del potencial de O-R, un potencial elevado (oxidante) favorece el crecimiento de los microorganismos aerobios, aunque permitirá el crecimiento de los facultativos, mientras que un potencial bajo (reductor) favorece el crecimiento tanto de los microorganismos anaerobios como el de los facultativos (Brown y Emberger, 1980).

No obstante, algunos microorganismos que se consideran aerobios son capaces de crecer (aunque no crecen bien) a potenciales de O-R sorprendentemente bajos. El crecimiento de un determinado microorganismo puede modificar el potencial de O-R de un alimento lo suficiente como para impedir que crezcan otros. Es posible que los microorganismos anaerobios, por ejemplo, reduzcan el potencial de O-R hasta un valor que inhiba el crecimiento de los microorganismos aerobios (Brown y Emberger, 1980).

La mayoría de los alimentos frescos, tanto los de origen vegetal como los de origen animal, tienen en su interior un potencial de O-R bajo y bien equilibrado: los de origen vegetal porque contienen sustancias reductoras, como por ejemplo ácido ascórbico y azúcares reductores, y los tejidos animales porque contienen radicales sulfhidrilo (-SH) y otros grupos reductores (Brown y Emberger, 1980; Frazier y Westhoff, 1993).

Los tratamientos térmicos, al destruir o modificar las sustancias reductoras y las oxidantes, pueden reducir la capacidad de equilibrio redox del alimento, permitiendo también una difusión más rápida del oxígeno hacia el interior del alimento, debido a las modificaciones que experimenta la estructura física del mismo. Los tratamientos industriales también pueden eliminar las sustancias reductoras y las oxidantes; por ejemplo los jugos de frutas exentos de pulpa pierden las sustancias reductoras por ser eliminadas durante su extracción y filtración las que constituyen un medio de crecimiento para las levaduras que resulta más apropiado que el jugo original que contenía la pulpa (Frazier y Westhoff, 1993).

Si bien cuando la concentración de oxígeno es baja los mismos microorganismos aerobios o facultativos pueden dar lugar a compuestos parcialmente oxidados, por ejemplo, ácidos orgánicos originados a partir de carbohidratos, cuando existe abundante oxígeno disponible pueden oxidarlos totalmente a dióxido de carbono y agua (Frazier y Westhoff, 1993).

I.5. Disponibilidad de nutrientes

Los hidratos de carbono, sobre todo los azúcares, son los nutrientes más comúnmente utilizados por los microorganismos como fuente de energía, aunque otros compuestos de carbono pueden ser útiles tales como los ésteres, los alcoholes, los péptidos, los aminoácidos, y los ácidos orgánicos y sus sales (ICMSF II, 1980).

Los microorganismos también se diferencian por su distinta capacidad para utilizar determinados carbohidratos. Por ejemplo, algunos microorganismos no son capaces de utilizar el disacárido lactosa (azúcar de la leche) y, por lo tanto, no crecen bien en la leche. Algunas levaduras no utilizan la maltosa.

Los azúcares, tales como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa que se encuentran frecuentemente en los alimentos y bebidas son convertidas por acción de las levaduras principalmente en etanol y dióxido de carbono, produciendo un defecto en sus características organolépticas y sensoriales. Además, las levaduras pueden producir compuestos secundarios, como alcoholes superiores, ácidos orgánicos, glicerol, ésteres, aldehídos, cetonas, y compuestos volátiles de azufre. Aunque estos compuestos son producidos en bajas concentraciones, tienen un alto impacto en la calidad sensorial. Sin

embargo, existe una diversidad significativa entre especies y cepas de levadura con respecto a los mecanismos de producción de estos metabolitos (Fleet, 2011).

En general, los hongos filamentosos son los microorganismos que crecen en medios con las concentraciones de azúcares más elevadas, mientras que las levaduras crecen en concentraciones de azúcares medianamente elevadas, y la mayoría de las bacterias crecen mejor en concentraciones de azúcares más bajas. Naturalmente, existen notables excepciones a esta regla general: las levaduras osmófilas crecen en concentraciones de azúcar tan elevadas como las concentraciones a las que crecen los hongos (Frazier y Westhoff, 1993).

I.6. Temperatura

La temperatura de crecimiento de los microorganismos se puede caracterizar por un rango de temperaturas que abarcan temperaturas mínimas, óptimas y máximas. Los límites de temperatura y el rango de crecimiento de las levaduras varían según la especie y la cepa. Aunque en general, el rango de temperatura de crecimiento de las levaduras se extiende desde 0 a 50 °C, la mayoría de las levaduras son mesófilas, es decir, crecen mejor en rangos de temperatura que van desde los 20 a 30 °C. Este es el caso de *Zygosaccharomyces rouxii* cuya temperatura óptima de crecimiento es de 28°C aunque también puede crecer hasta los 40°C (Nickerson y Sinskey, 1972).

Probablemente la temperatura sea el factor más importante ya que afecta la duración de la fase de latencia, la velocidad de crecimiento, al número final de células y la composición química y enzimática de las células. Los efectos de la temperatura sobre los microorganismos pueden ser debidos a valores altos o bajos de dicho factor, aunque cada microorganismo presenta un rango distinto de respuesta. Por debajo del punto de congelación pueden formarse cristales de agua que dañen la estructura celular, destruyendo la pared y membrana citoplasmática. En el otro extremo las temperaturas por encima del óptimo de crecimiento pueden provocar la desnaturalización de proteínas y enzimas necesarias para la supervivencia celular (Frazier y Westhoff, 1993).

El proceso de desecación de un determinado alimento, que alcanza temperaturas elevadas, ocasiona una reducción del número total de microorganismos, aunque su eficacia depende tanto de las especies y del número de los mismos inicialmente

existentes en el alimento en cuestión, como del procedimiento de desecación que se emplee. Normalmente resultan destruidas todas las levaduras, la mayoría de las bacterias y también las células vegetativas de unas pocas especies de bacterias termo-resistentes. Sin embargo, durante el envasado y durante cualquier otra manipulación del alimento una vez desecado, puede existir cierta posibilidad de que se contamine (Berry y col., 1956; Rushing y Senn, 1964.).

Por otro lado, como mencionamos con anterioridad, cada microorganismo existente en el alimento tiene una temperatura óptima, o más apropiada, para multiplicarse y una temperatura mínima, por debajo de la cual es incapaz de multiplicarse. Conforme desciende la temperatura desde esta temperatura óptima hacia la mínima, la velocidad de multiplicación de los microorganismos disminuye, siendo muy lento el desarrollo a la temperatura más baja que permite su crecimiento. Temperaturas más bajas que la mínima, inhibirán el crecimiento, aunque es posible que continúe su actividad metabólica a un ritmo más lento. Las temperaturas bajas se emplean para retardar las reacciones químicas y la actividad de los enzimas de los alimentos así como para retardar o detener la multiplicación y la actividad de los microorganismos existentes en los mismos. Cuanto más baja sea la temperatura, tanto más lentas serán las reacciones químicas, la actividad enzimática y la multiplicación de los microorganismos; una temperatura suficientemente baja impedirá la multiplicación de cualquier microorganismo condicionando que el mismo se mantenga en fase de latencia (Tompkin, R.B, 1973).

Los conceptos expuestos con anterioridad destacan la importancia del conocimiento de los factores intrínsecos del sustrato, tanto físico-químicos como aquellos otros de carácter químico que resultan limitantes para el desarrollo de microorganismos en los alimentos y representan un factor importante para la Microbiología de los alimentos (ICMSF II, 1980; Martorell y col., 2005; Martorell y col., 2007).

1.7. Definición de jugo de uva concentrado o jarabe de uva

El Código Alimentario Argentino (CAA) - Artículo 775bis - (Res 127, 20.02.89), define como jugo de uva concentrado “*al producto obtenido del mosto de uva sin fermentar por deshidratación parcial mediante procesos térmicos al vacío o a presión normal o cualquier otro proceso físico, sin haber sufrido una caramelización sensible*”.

El producto se rotulará en el cuerpo del envase: “*Contiene Mosto de Uva concentrado o contiene Jarabe de Uva*” (Código Alimentario, Cap. X “Alimentos azucarados”).

Deberá responder a las siguientes características:

- Líquido espeso, limpio, libre de depósitos, de sabor dulce.
- Acidez total en ácido tartárico: Máx 9 g/kg
- Acidez volátil en ácido acético: 0,0 g/kg
- Alcohol v/v: 0,0%
- Anhídrido sulfuroso total: Máx 70 mg/kg
- Arsénico, como As: Máx 1 mg/kg
- Azúcares reductores: Min, 800 g/kg
- Cobre, como Cu: Máx 2 mg/kg
- Extracto seco a 100°C: Min, 900 g/kg
- Peso específico 15/15°C: Min, 1,30 g/mL
- Plomo, como Pb: Máx 1 mg/kg
- Relación P/Ó: Máx -5
- Sales tartáricas 48 hs a 0°C: ausencia
- Sustancias conservadoras: 0,0 mg/kg

1.7.1. Etapas para la elaboración de jugos de uva concentrados

El proceso comienza con la recepción del jugo de uva o mosto sulfitado, posteriormente se realiza la decoloración mediante adición de carbón activado y clarificación por el agregado de bentonita (entre 50 y 200 g/L). Luego, se realiza la filtración de los jugos de uva con tierras de diatomeas y el almacenamiento de los mismos en piletas de hormigón armado con recubrimiento con pintura epoxi. Para aumentar la acidez y disminuir su coloración, se hace pasar el jugo por una columna catiónica y luego se somete al mismo a un proceso de desulfitado. El equipo está compuesto por una columna de rectificación con lecho de anillos cerámicos donde se elimina el anhídrido sulfuroso (SO₂) contenido en el mosto mediante una corriente de vapor que se pone en contacto con el mosto en contracorriente. El vapor rico en SO₂ que sale por la cabeza de la columna se condensa y reacciona con una solución alcalina donde queda retenido. El mosto entra a la torre con 1500 a 1700 ppm de SO₂ y sale con 60 ppm de SO₂. En la siguiente etapa de pre-concentrado, se eleva la concentración de azúcar del mosto de 20

a 45 °Brix. El mosto sale con una temperatura de 45°C y pasa por un intercambiador de superficie para bajar su temperatura a 1-3 °C. La finalidad de esta etapa es enfriar el mosto pre-concentrado para que en la etapa siguiente precipiten los bi-tartratos. Luego de la decantación de las sales tartáricas se procede a la segunda filtración del mosto con la finalidad de eliminar las partículas que puedan haber quedado en suspensión. La concentración del mosto incluye diferentes etapas o efectos. En el primer efecto la temperatura llega a los 100-110 °C, en el segundo efecto, la temperatura que se alcanza es de 90-95°C, en el tercer efecto la temperatura llega a 75 °C aproximadamente y en el cuarto y último efecto la temperatura de salida del jugo ya concentrado a 68 °Brix es de 40-50°C. Posteriormente, el jugo de uva concentrado es enfriado e inmediatamente almacenado en un tanque para su posterior fraccionamiento en el cual se inyecta N₂ para crear una atmósfera inerte (figura I.1). En algunas empresas se incluye una etapa de pasteurización previa al envasado.

El envasado del jugo concentrado se realiza en condiciones de esterilidad y puede ser fraccionado en tambores metálicos que almacenan hasta 200 litros y dentro de los cuales se encuentra una bolsa de polipropileno doble irradiada. Otros envases muy utilizados son los bins de madera de capacidad de 300 galones que en su interior se encuentra una doble bolsa de polipropileno de alta densidad. El flexitank, también llamado flexibag o flexitanque, es una bolsa o tanque flexible de gran tamaño el cual es un sistema de transporte marítimo de líquidos a granel seguro y eficiente. Permite transportar entre 21.000 a 24.000 litros, y es uno de los sistemas más utilizados en la industria del jugo de uva concentrado.

La industrialización de la uva para la obtención de jugos concentrados presenta varias etapas de procesamiento las cuales incluyen tratamientos térmicos que afectan la microbiota presente en la materia prima (ICMSF I, 1980). A pesar de esto los productos no están libres de presentar problemas por microorganismos que deterioran la calidad del mismo. La alteración microbiana puede ocurrir en cualquier etapa en toda la cadena de producción desde la materia prima, durante la manipulación y el procesamiento, e incluso en el producto envasado.

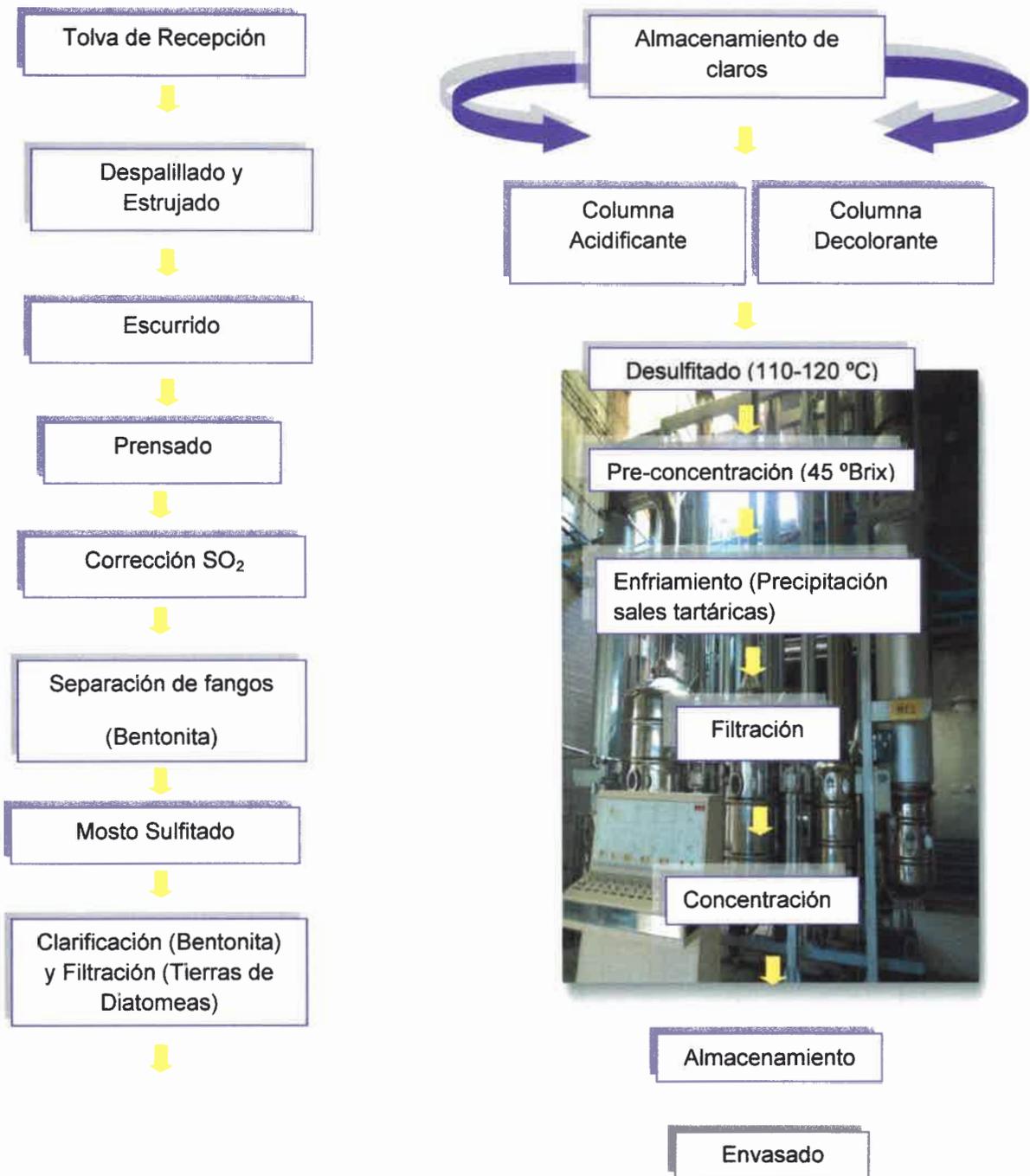


Figura I.1. Esquema del Proceso de elaboración del jugo de uva concentrado

I.8. Aplicaciones e importancia del jugo de uva concentrado

El jugo de uva concentrado es un *commodity* y por su carácter natural se utiliza para la elaboración de alimentos para neonatos, jugos mezcla, golosinas, dulces, mermeladas, jaleas y panificados, se utiliza como edulcorante de bebidas gaseosas y en la industria farmacéutica (Bruzzone, 1998). Es por ello, que cada año las exigencias en calidad e inocuidad del producto se hacen más estrictas en los mercados compradores.

La industria del jugo de uva concentrado (JUC) nació en la década de 1980, como alternativa en momentos en que el consumo de vino había disminuído. Fue la forma que encontraron los productores para darle utilidad a los excedentes de la industria vitivinícola, y es por eso que su producción se expande en la zona de viñedos, es decir, en el este y el norte de las provincias de Mendoza y San Juan (Ablin, 2012). La actividad cobró gran impulso en la década de 1990, presentando altibajos en sus exportaciones, producto tanto de factores internos, ligados a la política económica del país, como factores externos, que dependían de la alta o baja producción de su principal cliente: Estados Unidos. El negocio mundial del jugo de uva concentrado es muy dinámico y su desarrollo anual depende de distintas variables nacionales (costos, oferta de uva, precios locales) e internacionales (oferta del producto, valor de productos sustitutos, volumen de demanda, etc.) que determinan cómo se repartirá el mapa del comercio entre los países productores. Los principales exportadores mundiales de JUC son Argentina, Estados Unidos, Italia y España, seguidos por Chile (Ablin, 2012). Estados Unidos absorbe el mayor porcentaje de la producción mundial destinada a exportación, lo que ubica a este país en una situación ambivalente, por un lado, ser el principal comprador y por otro, uno de los principales competidores de sus proveedores (www.agronomia.uchile.cl). Japón y Canadá son los otros dos grandes importadores de jugo de uva concentrado. En los últimos años, la demanda mundial de jugo de uva concentrado ha ido en aumento. En lo que se refiere a la producción mundial, el porcentaje que cada país productor destina a la elaboración de jugo de uva concentrado es diferente, y varía de acuerdo a los volúmenes de uva totales producidos y también en función de su consumo interno (Ablin, 2012).

Argentina se ha posicionado en los últimos años como una de las regiones más importantes a nivel mundial en lo que se refiere a la producción y exportación de uvas y

sus derivados (vinos, mostos, pasas de uva y uva de mesa), ya que presenta zonas aptas para el cultivo de la vid con condiciones climáticas y geológicas favorables (Rocco, 2008). En Argentina la mayor parte de la producción de uva se destina a vino, y a mosto sulfitado que es la materia prima para la elaboración del jugo de uva concentrado. Actualmente Mendoza produce el 51% y San Juan el 49% del jugo de uva concentrado nacional (INV, 2013) (figura I.2). Cabe destacar que este producto es uno de los productos líderes exportados por Mendoza, encontrándose en el cuarto puesto del *ranking*, luego del vino fraccionado, los alimentos para animales y el ajo fresco (Ablin, 2012).



Figura I.2. Áreas vitivinícolas en las dos principales provincias productoras de jugo de uva concentrado

El año 2011 fue favorable para la industria argentina del jugo de uva concentrado ya que se presentó una baja en la producción de uvas en California, junto con una disminución de la producción China de jugo de manzana concentrado, lo que le permitió a nuestro país una recuperación del precio del jugo de uva y un aumento de la demanda internacional. En el mismo año, Argentina fue el segundo exportador de jugo de uva luego de Italia. Los principales compradores del producto siguen siendo Estados Unidos, Japón y Canadá (Ablin, 2012). Debe destacarse que el jugo de uva concentrado es uno de los productos más solicitados para la elaboración de jugos naturales en el mundo, ya que según datos del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), la tendencia hacia el consumo de productos naturales posiciona al jugo como un producto de exportación más que de consumo interno. De hecho, el uso de mosto como endulzante

natural, en reemplazo de los azúcares refinados, convierte a Mendoza y a San Juan, en los principales elaboradores nacionales de este producto (INV, 2013).

En nuestro país, la utilización del jugo de uva concentrado para elaborar jugos de frutas, golosinas y dulces es mínima: el empleo de este producto con ese destino oscila entre el 5 y el 10%. Por ejemplo, empresas como Arcor, Cadbury, Dulcor y Dulciora, usan el jugo de uva entre sus ingredientes. También, se registró hace unos años atrás una experiencia conjunta entre el INV y la Universidad Nacional de Cuyo para elaborar panificados dulces con este producto como base para endulzar. Complementariamente, se podría fomentar el consumo interno por medio de la publicidad y otras herramientas de promoción, potenciando así la demanda a nivel local del jugo de uva, al igual que se comercializa el jugo de manzana, naranja y otras frutas. Además, a nivel nacional, la actividad debería apuntar a posicionar el jugo de uva como un producto saludable, natural y sabroso, procurando convertirlo en otra de las bebidas que la población incluya entre las opciones de consumo (Ablin, 2012).

Por otro lado, es importante destacar que la Cámara Argentina de Exportadores de Mosto lanzó en 2009 el Plan Estratégico de Jugo de Uva Concentrado, en el marco del Plan Estratégico Vitivinícola 2020. Este plan tiene como objetivo formular la cadena de valor del jugo de uva y establecer que este producto tenga un valor propio y no sea considerado un simple subproducto del vino. Los objetivos de este programa giran alrededor de cuatro ejes: especialización; industrialización; comercio exterior; e investigación y desarrollo (Infocampo, 2011)

El criterio de la cámara del mosto, que agrupa a todos los productores de mosto del país, es presentar el plan final conjuntamente con el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que ya realizaron el diagnóstico del sector que será la base para establecer la estrategia final (Ablin, 2012). A su vez, existen dos convenios que reforzarán la política vitivinícola regional. Estos instrumentos fijan el cupo de elaboración del mosto en 30% como porcentaje mínimo del total de uva ingresada a bodega, sellando el compromiso de destinar recursos para incentivar la elaboración del jugo de uva (www.sitioandino.com).

En cuanto a la situación institucional, hay una situación favorable que debe ser aprovechada, como es la existencia de la COVIAR (Corporación Vitivinícola Argentina) creada según ley 25849, destinada a gestionar y coordinar la implementación del PEVI 2002-2020 (Plan Estratégico de la Vitivinicultura Argentina), cuya misión y objetivo es promover tanto la organización e integración de los actores de la cadena productiva, como la innovación de productos y procesos que acrediten el valor agregado del sector, con la finalidad de ganar, mantener y consolidar mercados externos, consolidar el mercado interno argentino y lograr el desarrollo sostenido del sector.

Por otro lado, los rechazos por alteraciones microbianas en partidas exportadas, producen importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la calidad del producto, costo de limpieza de la planta concentradora, la retirada del producto del país de destino, la investigación para determinar la causa y la responsabilidad y el impacto negativo que esto genera en la imagen de la marca y reputación de la empresa. También dañan la imagen internacional del país, afectando futuras exportaciones y la apertura de nuevos mercados (Piper, 2011).

I.9. Levaduras

I.9.1. Generalidades

Las levaduras se clasifican principalmente en base a sus caracteres morfológicos, aunque para el microbiólogo de alimentos, sus propiedades fisiológicas tienen mayor importancia.

○ Caracteres morfológicos

Los caracteres morfológicos de las levaduras se determinan mediante la observación microscópica de la forma y estructura. La forma de las levaduras puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada, constituyendo un verdadero o falso micelio. También se diferencian en cuanto a su tamaño. Son partes observables de su estructura, la pared celular, el citoplasma, las vacuolas de agua, los glóbulos de grasa, y los gránulos, los cuales pueden ser metacromáticos, de albúmina o de almidón (figura I.3) (Bessey, 1950; Barnett, 2000).

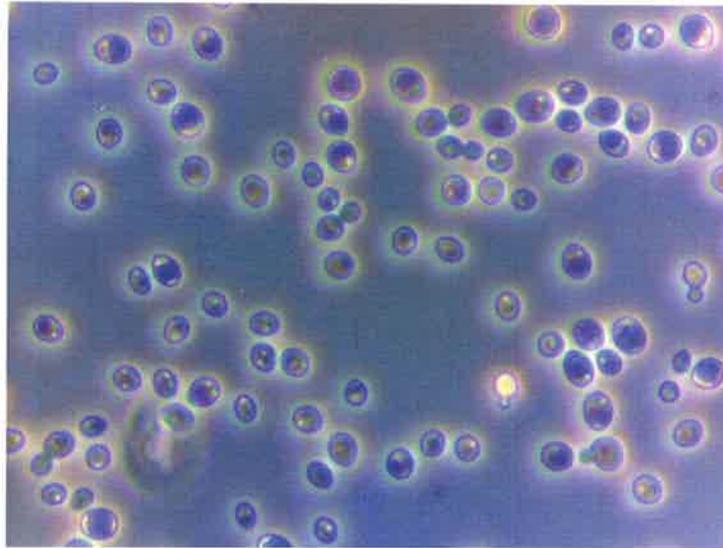
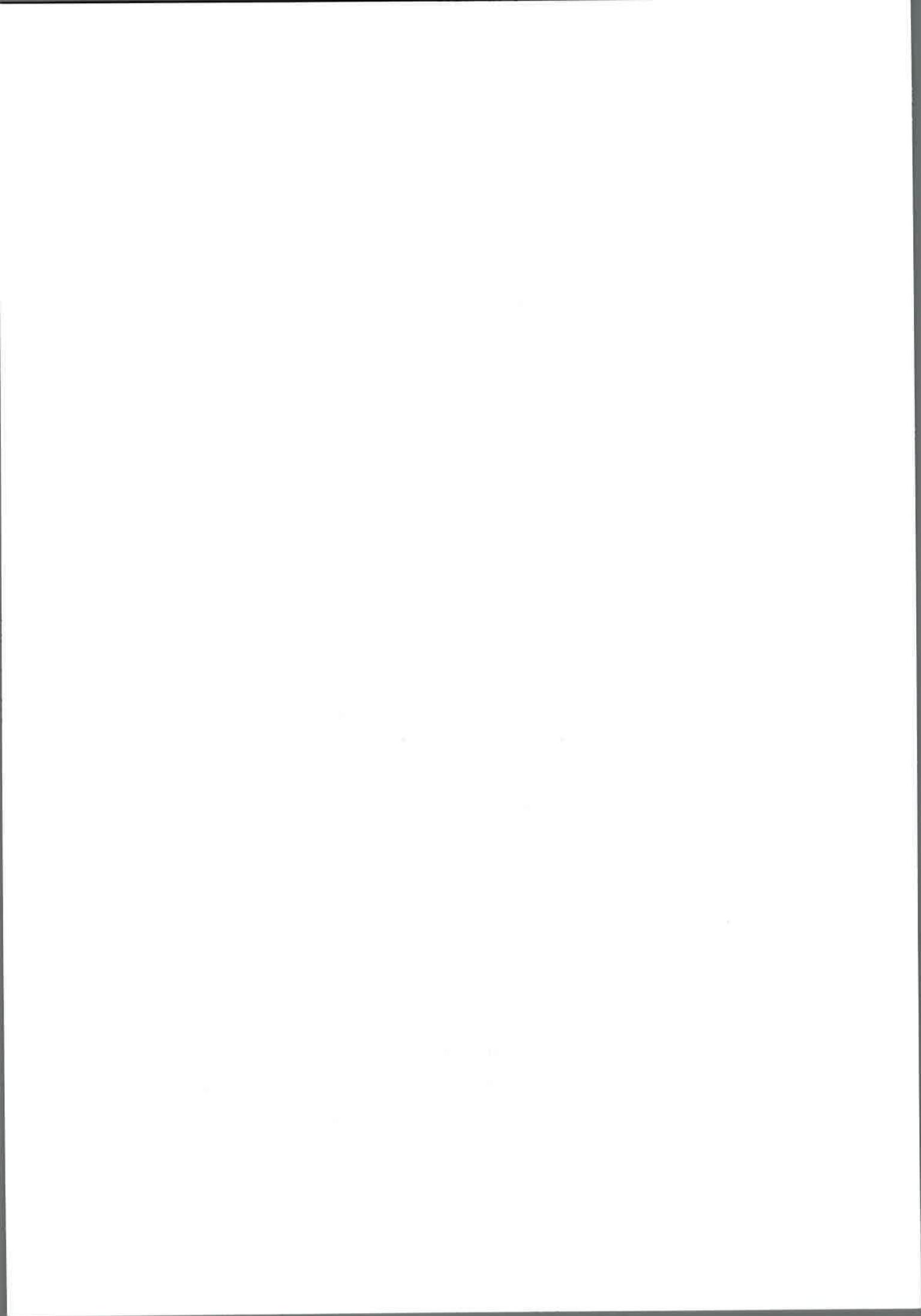


Figura I.3. Observación microscópica de *Zygosaccharomyces rouxii* (400 X)

○ Reproducción

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar, mecanismo de reproducción mediante el cual una porción del protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia o yema, que aumenta de tamaño y finalmente se desprende como una nueva célula de levadura. En algunas levaduras, y principalmente las que forman película, la yema crece a partir de una prolongación tubuliforme de la célula madre. El material nuclear replicado se reparte entre la célula madre y la célula hija. Unas pocas especies de levaduras se reproducen por fisión, y una sola se reproduce mediante una combinación de los mecanismos de fisión y gemación (Rose y Harrison, 1971).

La reproducción sexual de las levaduras del Orden *Ascomycotina* da lugar a la producción de ascosporas, desempeñando la función de asco la propia célula de levadura. En la mayoría de las especies de levaduras, la formación de ascosporas tiene lugar tras la conjugación de dos células, aunque algunas pueden producir ascosporas sin que exista conjugación previa, teniendo lugar después la conjugación de las ascosporas o células hijas de pequeño tamaño. Tanto el número habitual de esporas por asco, como el aspecto de las ascosporas, son típicos de cada especie de levadura. Las ascosporas se pueden diferenciar por su color, por la rugosidad o no de su pared, y por su forma



(redondeada, ovalada, arriñonada, forma o falciforme, forma de sombrero, hemisférica, angular, fusiforme, y aciculada) (Rose y Harrison, 1971).

Las levaduras que no producen ascosporas ni otro tipo de esporas, pertenecen a los hongos imperfectos. Las células de algunas levaduras se transforman en clamidosporas mediante la formación de una gruesa pared alrededor de la célula, tal como ocurre, por ejemplo, en las especies de los géneros *Candida*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (Rose y Harrison, 1971).

○ Características de los cultivos

En la mayoría de los casos, el crecimiento de las levaduras no resulta apropiado para identificar estos microorganismos, si bien el crecimiento en forma de velo en la superficie de los medios líquidos indica que se trata de una levadura oxidativa o formadora de velo, y la producción de un pigmento carotenoide confirma que la levadura que ha crecido pertenece al género *Rhodotorula* (Bessey, 1950; Barnett, 2000).

La mayoría de las colonias de levaduras son húmedas y algo mucosas, aunque es posible que tengan aspecto harinoso; la mayoría son blancuzcas, aunque algunas tienen un color crema o rosado (figura I.4). Algunas colonias cambian poco de aspecto cuando envejecen, aunque otras se secan y se arrugan (Bessey, 1950; Barnett y col., 2000).

Las levaduras son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos. En la superficie de un líquido, las levaduras oxidativas pueden crecer en forma de película, de velo, o de espuma. Las levaduras fermentativas suelen crecer en toda la masa del líquido y producen dióxido de carbono (Bessey 1950).



Figura I.4. Colonias de la levadura *Zygosaccharomyces rouxii* en medio TGY

○ Propiedades fisiológicas

A pesar de que las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiología, las que tienen importancia en la industria comparten características fisiológicas. La mayoría de las levaduras crecen mejor en condiciones de actividad acuosa elevada. No obstante, muchas levaduras crecen mejor en sustratos que contienen elevadas concentraciones de solutos (de azúcar o de sal, por ejemplo), de ello se puede deducir que esta clase de levaduras necesitan menos humedad que la mayoría de las bacterias. La mayoría de las levaduras, sin embargo, necesitan más humedad que los hongos filamentosos (Cook, 1958).

Para una determinada combinación de factores del medio en el que se encuentra, cada levadura tiene su propia a_w óptima de crecimiento que la caracteriza y su propio intervalo de valores de a_w dentro del cual es posible su desarrollo. Estos valores de a_w varían según las propiedades nutritivas del sustrato, el pH, la temperatura, cantidad de oxígeno disponible, y la existencia o ausencia de sustancias inhibitoras (Martorell y col., 2007)

El intervalo de temperaturas de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general, parecido al de los hongos filamentosos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima próximo a los 35 - 47°C. Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0°C o inferiores (Vidal-Leira y col., 1979).

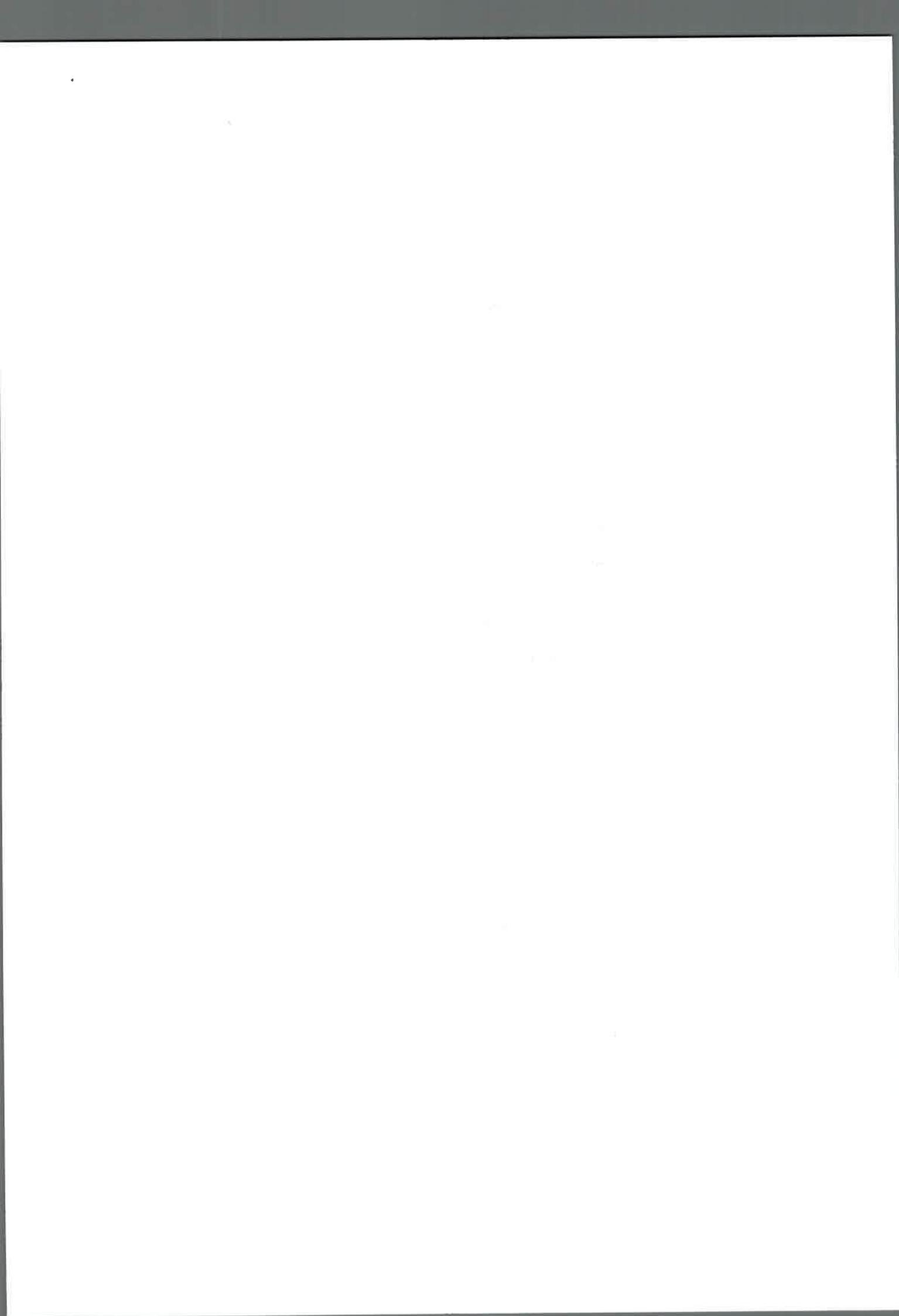
Una condición ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4,5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos. Las levaduras crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis (Frazier y Westhoff, 1993).

En general, los azúcares son la fuente energética más apropiada para las levaduras, aunque las levaduras oxidativas, por ejemplo las formadoras de película, oxidan los ácidos orgánicos y el alcohol. El dióxido de carbono que producen las levaduras que se utilizan en panificación, completa la fermentación del pan, mientras que el alcohol producido por las levaduras fermentativas es el principal producto en la producción de vino, cerveza, alcohol industrial y otros productos (Fleet, 2011).

I.9.2. Taxonomía e identificación de levaduras

Aproximadamente 100 géneros de levaduras comprendiendo más de 700 especies han sido descritos, (Kurtzman y Fell, 1998), aunque la evidencia sugiere que esas especies representan menos del 1% de las especies que realmente se encuentran en la naturaleza (Kurtzman y Fell, 2004). Barnett y col. (2000) en su revisión taxonómica, incluyen además de la descripción de 678 especies de levaduras, un listado de nombres con los cuales las levaduras han sido mencionadas en publicaciones en el siglo XIX; dicho listado incluye alrededor de 4000 opciones. Esta información resulta fundamental dado el continuo cambio que se ha producido en la taxonomía de muchas levaduras. Parte de esta labilidad en la nomenclatura de las levaduras se debe a la confusión entre estudios de clasificación y evolución; cada vez que un investigador tuvo una nueva idea acerca de las relaciones ancestrales de algunas levaduras, los nombres fueron cambiados. Otra fuente de confusión dentro de la taxonomía de levaduras ha estado dada por la práctica aceptada, aunque “absurda” de dar diferentes nombres a dos levaduras idénticas pero con la diferencia de que el estado sexual ha sido observado en una de ellas (teleomorfo) y no en otra (estado asexual o anamorfo) (Barnett y col. 2000).

Antes de la era actual de la taxonomía de levaduras, la cual utiliza secuencias de ADN y otros criterios moleculares, las especies y géneros eran definidos en base a caracteres fenotípicos como morfología celular y respuesta a diversos test de crecimiento. Estudios recientes acerca de cruzamientos genéticos y comparaciones moleculares han mostrado que los caracteres previamente considerados como taxonómicamente definitivos varían entre cepas de la misma especie. Como consecuencia, al aplicar sólo criterios de taxonomía clásica, cepas divergentes de la misma especie podrían ser clasificados dentro de distintos taxones, mientras que nuevas especies podrían permanecer sin ser reconocidas. En la actualidad es un hecho ya aceptado que deben utilizarse métodos de biología molecular para la identificación de levaduras si se desea obtener una correcta asignación de la especie (Kurtzman y Fell, 2004). La aplicación de métodos de biología molecular brinda un mayor grado de claridad en estudios de ecología de levaduras, lo cual no era posible cuando las levaduras eran identificadas a partir de características fenotípicas. Los estudios de biología molecular aplican el criterio de que mientras más cercana es la relación ancestral entre dos organismos, mayor es el número de bases en



común dentro de una secuencia de ADN. En ese sentido, Kurtzman y Robnett (1998) definieron el criterio de especie de levadura a partir del uso de secuencias del dominio D1/D2 cercano al extremo 5' de la subunidad mayor 26S del rRNA, y establecieron que un grupo de cepas que presentan menos de 1% de diferencias nucleotídicas puede ser considerada como la misma especie.

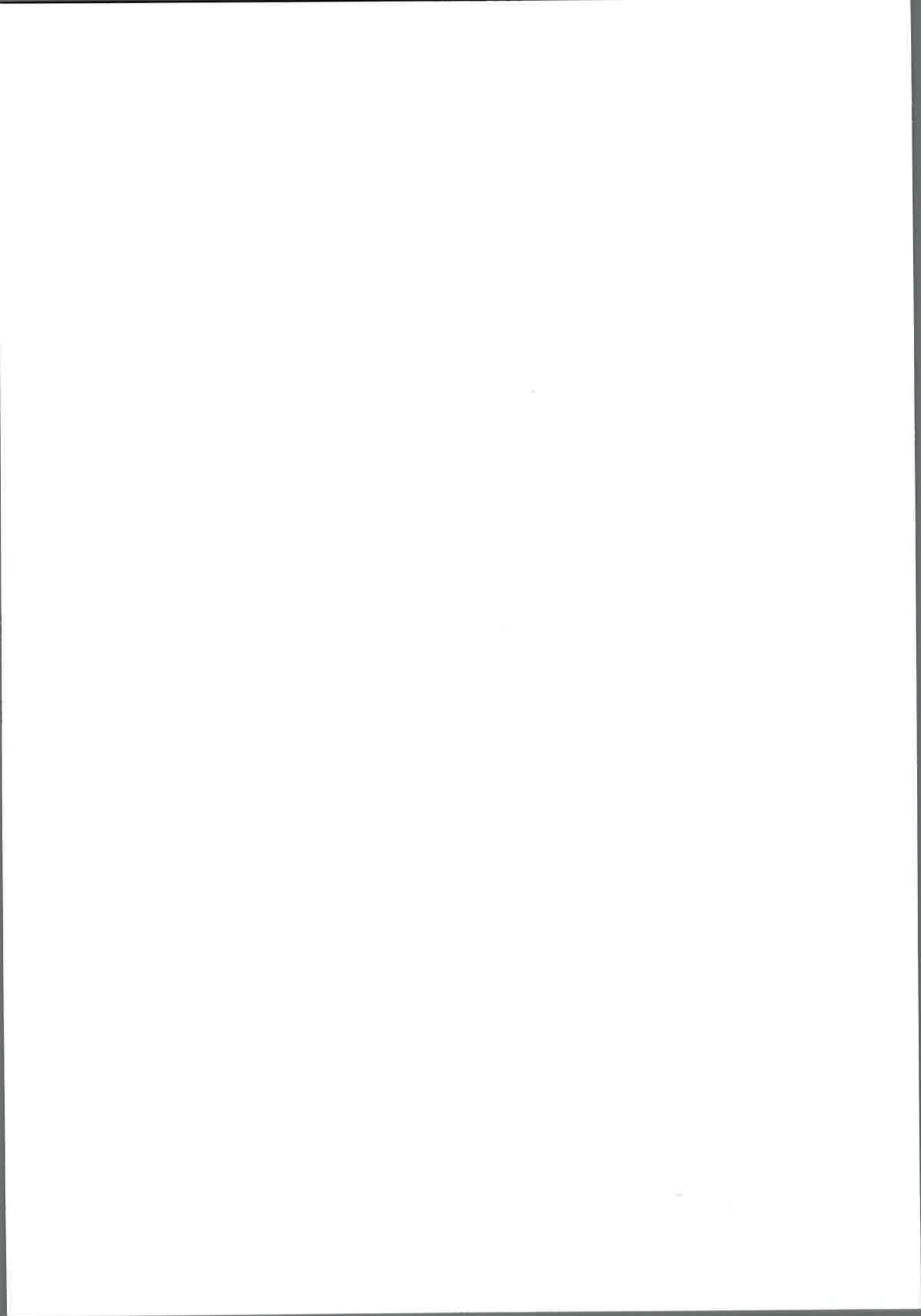
Muchas técnicas se han desarrollado usando las herramientas ofrecidas por la biología molecular y varias de ellas son útiles para identificar y caracterizar las levaduras a este nivel. Las técnicas más utilizadas para la identificación de levaduras en alimentos incluyen: métodos basados en el análisis de regiones ribosomales, incluyendo secuenciación de genes ribosomales (dominios D1/D2 del gen 26S y región 18S) y restricción de regiones ribosomales (amplificación de regiones 18S y región intergénica ITS1 o 5.8S más la región ITS1-ITS2, seguidos de digestión por diversas enzimas de restricción); otras técnicas como PCR DGGE (amplificación seguida de separación de fragmentos mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturizante) y PCR *real time* con *primers* específicos para una especie determinada, entre otras también han sido utilizadas (Fernandez-Espinar y col., 2011).

Si bien la taxonomía de levaduras es un campo en permanente expansión, afortunadamente sólo aproximadamente 15 géneros de levaduras se vinculan a la producción de vino, están asociadas a las uvas, involucradas en la fermentación alcohólica o son responsables de alteraciones o defectos en diferentes alimentos (tabla 1.2.).

Tabla I.2. Clasificación taxonómica de los géneros de levaduras comúnmente presentes en uva y vino, adaptado de Kurtzman y Fell (2006)

REINO	PHILUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO
<i>Fungi</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Schizosaccharomycetes</i>	<i>Schizosaccharomycetales</i>	<i>Schizosaccharomycetaceae</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
		<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Metschnikowiaceae</i>	<i>Metschnikowia</i>
					<i>Brettanomyces</i> (A)
					<i>Dekkera</i> (T)
				<i>Pichiaceae</i>	<i>Hansenula</i>
					<i>Issatchenkia</i>
					<i>Pichia</i> (T)
					<i>Kazachstania</i>
					<i>Saccharomyces</i>
				<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Torulaspora</i>
			<i>Zygosaccharomyces</i>		
			<i>Hanseniaspora</i> (T)		
		<i>Saccharomycodaceae</i>	<i>Kloeckera</i> (A)		
			<i>Saccharomyces</i>		

A: Anamorfo; T: Teleomorfo



I.9.3. Levaduras en Alimentos

Como se las definió anteriormente, las levaduras constituyen un grupo polifilético de hongos ascomycetes y basidiomicetes caracterizados por presentar una fase de crecimiento unicelular y estadios sexuales que no se encuentran encerrados en cuerpos fructíferos (Kutzman y Fell, 2004). El estudio científico de la microbiología de ciertos alimentos como pan, cerveza y vino comenzó a mediados del siglo XVII con las primeras observaciones de células de levaduras informadas por Antonie van Leeuwenhoek en Holanda. La trascendencia de esos hallazgos permaneció latente hasta los clásicos estudios de Pasteur y Hansen en el período 1850-1900, los cuales impulsaron el inicio de las disciplinas microbiología y bioquímica. Los estudios posteriores de Guilliermond y Kluyver a principio de 1900, establecieron a las levaduras como un único grupo de microorganismos que tienen un rol principal en la producción de bebidas y alimentos (Fleet, 2006). En un contexto positivo, las levaduras contribuyen a la fermentación de un amplio rango de materias primas, donde varias especies de levaduras desarrollan y transforman el sustrato, a menudo de manera conjunta o secuencial con otros microorganismos como bacterias y hongos filamentosos. Desafortunadamente hay un aspecto negativo en la actividad de las levaduras. Este es bien conocido en muchos sectores de la industria alimentaria y de bebidas por su capacidad de causar alteración generando importantes pérdidas económicas. A diferencia de lo que ocurre con otros patógenos, las levaduras no son conocidas como patógenos infecciosos agresivos. Sin embargo, algunas especies pueden ser clasificadas en la categoría de patógenos oportunistas (Fleet, 2006).

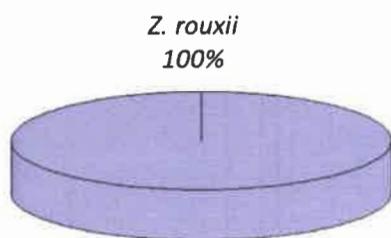
I.9.4 .Importancia de las levaduras en el jugo de uva concentrado

Si bien el jugo de uva concentrado es un sustrato microbiológicamente más estable que otros alimentos, no está exento de sufrir alteraciones, por lo tanto su adecuada conservación resulta esencial para prolongar su vida útil (ICMSF II, 1980; Splittstoesser, 1987). En general los alimentos con pHs bajos y con alta concentración de azúcar como es el jugo de uva concentrado, pueden ser alterados por distintas especies de levaduras. Si bien, una gran diversidad de especies han sido aisladas de alimentos y bebidas, sólo alrededor 20 de ellas pueden estar asociadas a alteración o deterioro de dichos alimentos, entre las que se incluyen diferentes géneros de levaduras

como: *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Debaryomyces* y *Pichia* (Fleet, 2011). La alteración es una consecuencia del desarrollo de estas levaduras en el producto. Los componentes de los alimentos son utilizados por las levaduras para su desarrollo y los transforman mediante diferentes rutas metabólicas en una amplia gama de productos. De esta manera, las propiedades físicas, químicas y sensoriales del producto se modifican, de manera tal que la alteración se hace evidente de muchas maneras dependiendo del producto (Stratford, 2006; Fleet, 2011).

Trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, han permitido caracterizar la población de levaduras osmófilas y osmotolerantes en 21 muestras de jugos de uva concentrados de Argentina, mostrando que la principal levadura presente tanto en muestras alteradas (5 muestras) como sin alteración visible (16 muestras), pertenecen a la especie *Zygosaccharomyces rouxii*, acompañada por otras especies de levaduras en menor proporción como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia anomala* y *Kluyveromyces delphensis* (figura I.5) (Combina y col., 2008). Este último trabajo permitió demostrar que *Z. rouxii* se aísla en la mayoría de las muestras de jugo de uva concentrado listas para ser comercializadas, y que es la responsable de la alteración de los mismos (Combina y col., 2008).

Jugos de uva concentrados alterados



Jugos de uva concentrados sin alteración

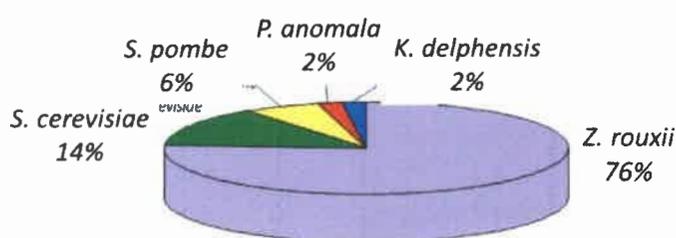
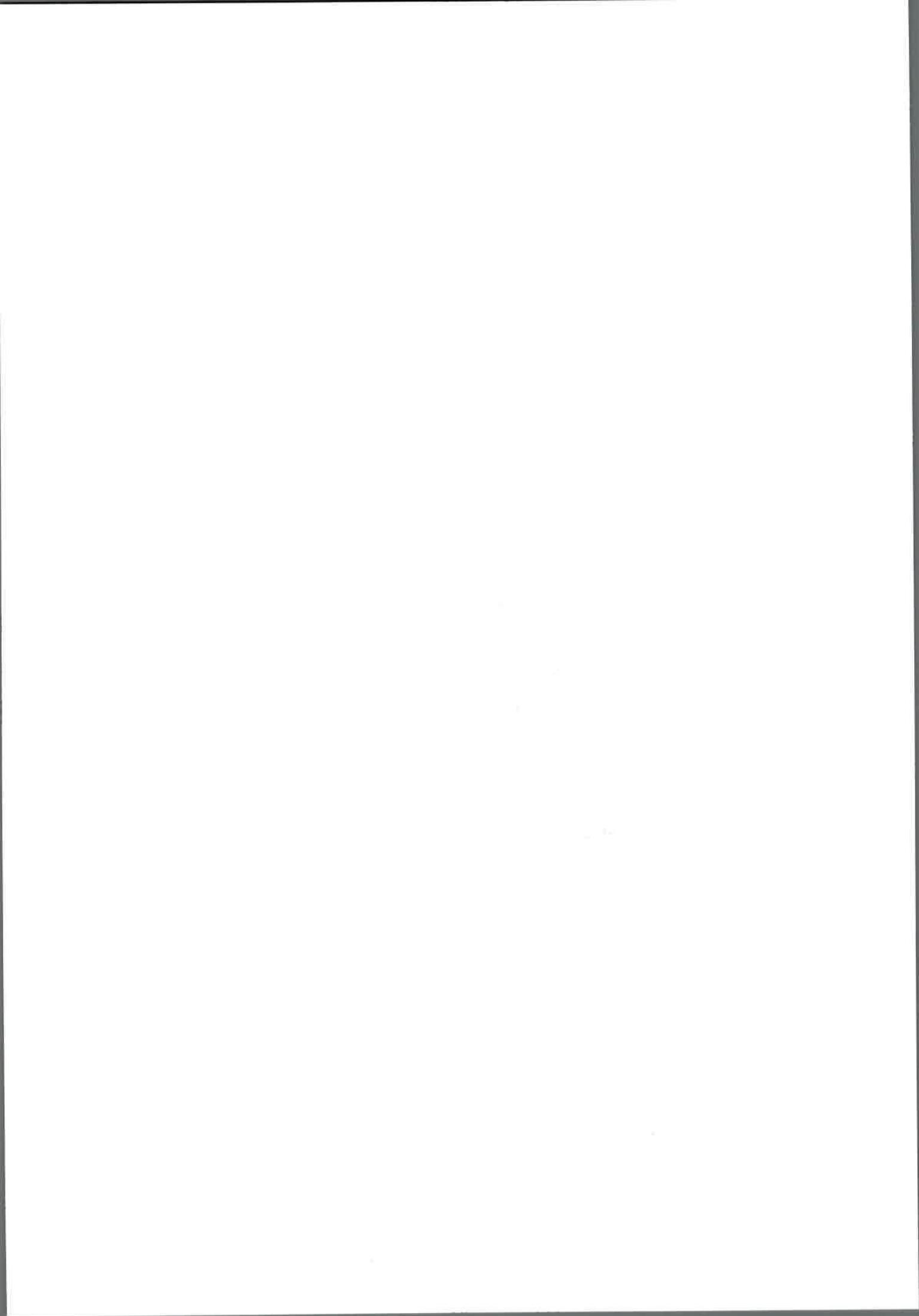


Figura I.5. Porcentaje de levaduras osmófilas y osmotolerantes en jugos de uva concentrados de Argentina.



I.9.5. Levaduras osmófilas: *Zygosaccharomyces rouxii*

Las levaduras del género *Zygosaccharomyces* pertenecen a la Familia *Saccharomycetaceae*. La que actualmente conocemos como *Zygosaccharomyces bailii* fue descrita, por primera vez, en 1895, por Linder como *Saccharomyces bailii*, y en el año 1983 se adoptó el actual género *Zygosaccharomyces* que incorpora once especies diferentes (Barnett y col., 1983). Entre estas especies, *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. rouxii*, *Z. florentinus* y *Z. lentus* han sido aisladas a partir de mosto de uva y vino (Fugelsang 1997). La morfología de las células y colonias varían según el medio de aislamiento. *Z. rouxii* presenta una morfología celular esférica, elipsoidal con gemación multilateral y posiblemente pseudohifas, con capacidad de conjugar célula-célula y presenta un crecimiento lento (Kurtzman, 1998c). En cuanto a sus características fisiológicas cabe mencionar su alta tolerancia a elevadas concentraciones de azúcares (a_w reducida), resistencia a elevado porcentaje de etanol (>18%) (Thomas y Davenport, 1985), alta resistencia a ácidos débiles y al SO_2 molecular (> 3 mg/L) y habilidad para crecer en condiciones de bajo pH (Emmerich y Radler, 1983; Steels y col., 1999; James y Stratford, 2003; Martorell, 2006; Martorell y col., 2007). *Z. rouxii* es una levadura osmófila, lo cual significa que es capaz de vivir en ambientes con elevadas concentraciones de solutos, sales o azúcares. Esta especie de levadura muestra mayor tolerancia que otras especies del mismo género, pudiendo crecer a concentraciones de hasta 50-70% (p/p) de azúcar (James y Stratford, 2003; Tofalo y col., 2009). *Z. rouxii* se ha aislado a partir de una amplia variedad de sustratos, incluyendo la caña de azúcar, jarabe de chocolate, jugo de uva concentrado, miel, mermelada, jarabe, mazapán, vino tinto, frijoles salados, refrescos y salsa de soja (Kurtzman 1990; Barnett y col., 2000).

Las alteraciones por especies del género *Zygosaccharomyces* pueden ser categorizadas en dos grupos: i) crecimiento visible en la superficie del producto, y ii) alteración por fermentación lo que se manifiesta por la producción de alcohol, ésteres y otro tipos de olores y/o evidencia visible de la producción de gas, lo que lleva a la expansión del envase (Legan y Voyset, 1991; Smith y col., 2004). *Z. rouxii* está asociada a la contaminación de plantas concentradoras de jugo de uva y bodegas, y la alteración que produce se manifiesta por la presencia de espuma, gas y olor a fermentado (Kurtzman y col., 1998; James y col., 2003). Estos defectos aparecen cuando el inóculo de la

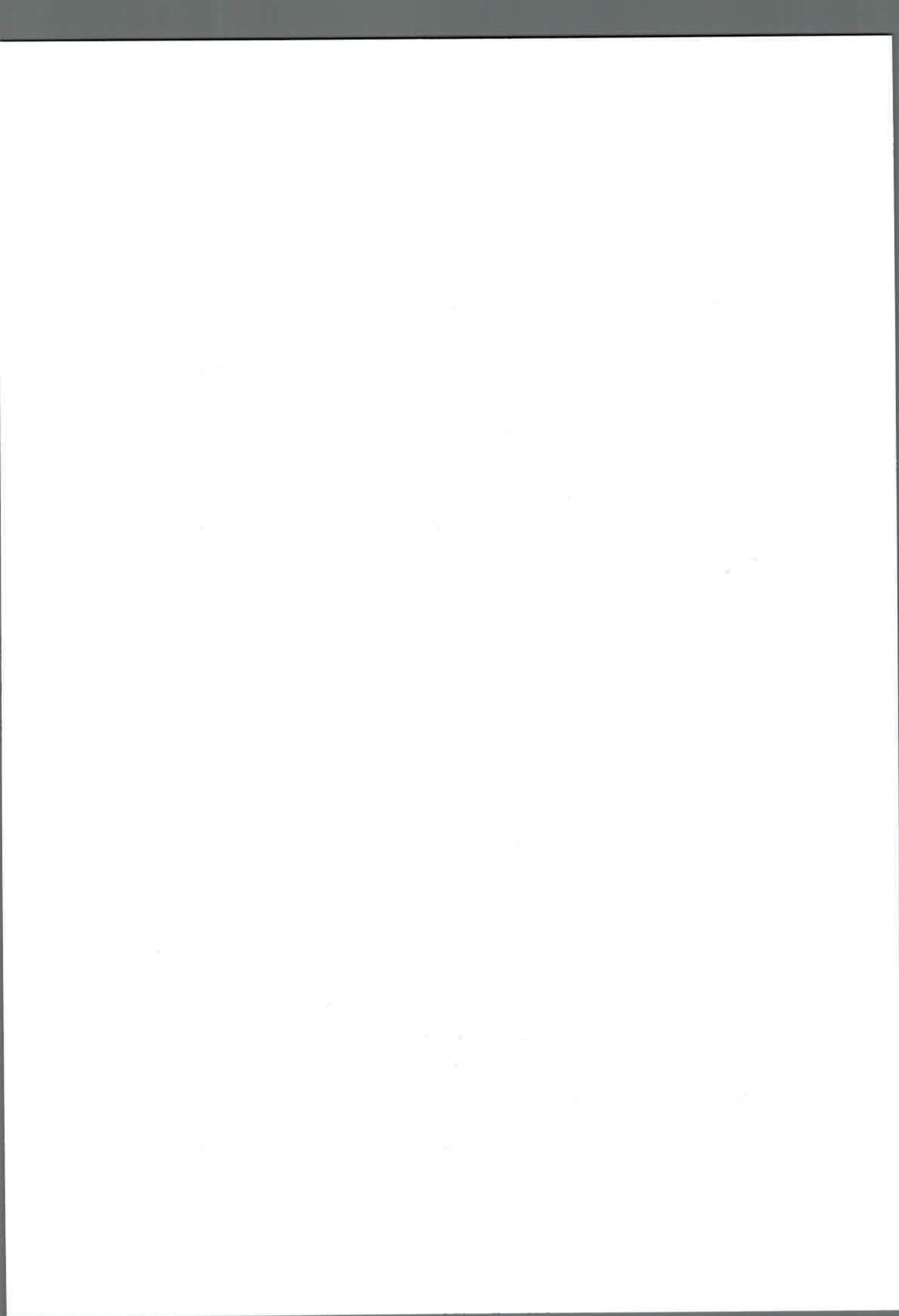
levadura llega aproximadamente a 10^4 - 10^5 UFC/g, y luego terminan por evidenciarse cuando el inóculo alcanza una población de 10^7 - 10^8 UFC/g (Fleet, 2011).

Las levaduras capaces de desarrollar a valores bajos de actividad de agua (a_w) han sido denominadas como osmófilas, osmotolerantes, osmoduricas, xerófilas o xerotolerantes. El valor más bajo de a_w en el cual una levadura no-osmófila puede desarrollar esta comprendido en el rango de 0,85–0,92 (ICMSF 1980 II). Entonces, según la definición, las levaduras capaces de desarrollar en alimentos con elevado contenido de solutos (es decir en $a_w < 0,85$) se denominan levaduras osmófilas. Dentro de este grupo se han descrito levaduras de los géneros *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Saccharomyces* y en menor frecuencia *Torulospora*, *Schizosaccharomyces* y *Pichia* (Suárez y col., 1981; Deák y Beuchat, 1993; Fugelsang 1998; Siloniz y col., 1999; Martorell y col., 2005, Combina y col., 2008).

I.10. Mecanismos de osmotolerancia de levaduras osmófilas

Para entender el comportamiento de los microorganismos expuestos a ambientes con baja a_w se deben conocer los mecanismos que éstos poseen para evitar la pérdida de agua por ósmosis. El nivel de la presión de turgencia tiene que ser mantenido para permitir la supervivencia celular y el crecimiento. Hay dos estrategias básicas que emplean los microorganismos: (i) Por un lado, la minoría de los microorganismos halófilos para mantener la presión de turgencia utilizan iones inorgánicos (generalmente KCl) para lograr la estabilidad osmótica; (ii) Por otro lado, la mayoría de los microorganismos halófilos y todos los xerófilos producen o acumulan compuestos orgánicos de baja masa molecular para mantener el potencial osmótico intracelular (Grant, 2004). Estos osmolitos, también conocidos como solutos compatibles, deben poseer cierta compatibilidad con la maquinaria celular, pero también deben ser capaces de proteger a la célula contra la inactivación, la inhibición y la desnaturalización de estructuras proteicas y otras macromoléculas en condiciones de baja a_w . Los solutos compatibles son polares o bipolares y pertenecen a varias clases de compuestos (Brown 1978,1990). Estos incluyen:

(i) Polioles tales como glicerol, arabitol, manitol, azúcares o los derivados de azúcar tales como trehalosa, sacarosa y glucosilglicerol;



- (ii) Betaínas (compuestos de trimetilamonio) y compuestos de sulfonio de dimetilo;
- (iii) Aminoácidos, incluyendo prolina, glutamato y glutamina;
- (iv) Aminoácidos N-acetilados;
- (v) Derivados de amida de glutamina
- (vi) Ectoines y ectoína.

Particularmente, los hongos y levaduras tienden a acumular alcoholes polihídricos tales como el glicerol y arabitol (Brewer 1999). Como regla general, este tipo de polioles son solutos compatibles acumulados de manera significativa en organismos xerófilos y organismos xerotolerantes (Brown 1990; Eriksen y McKenna 1999).

I.11. Microbiología predictiva

La falta de calidad de los alimentos y sus derivados puede ser la consecuencia de cambios físico-químicos, enzimáticos o microbiológicos. Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en la pérdida de calidad a través de su actividad metabólica. Por lo tanto, si se quieren establecer criterios confiables sobre la calidad de un alimento, su vida útil y su seguridad, es necesario disponer de datos cuantitativos sobre los efectos de los factores que afectan el crecimiento, la supervivencia e inactivación. Recientemente, con el avance informático, las técnicas para desarrollar modelos predictivos han mejorado ampliamente y es posible pensar en una base de datos para predicciones microbiológicas a ser utilizada por la industria y otros organismos relacionados a esta temática.

La microbiología predictiva consiste en el desarrollo de modelos matemáticos para predecir la velocidad de crecimiento o de decrecimiento de los microorganismos bajo un conjunto dado de condiciones ambientales (Walls y Scott, 1997). El conocimiento detallado del comportamiento del microorganismo frente a determinadas variables ambientales, es decir, el conocimiento de la ecología microbiana, permite evaluar objetivamente el efecto del procesamiento, la distribución y el almacenamiento en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos. Utilizando diseños experimentales adecuados y modelos matemáticos apropiados, la microbiología

predictiva permite la selección de los factores de preservación para alcanzar la vida útil deseada de determinado alimento y/o su derivado (Mc Meekin y col., 1993).

La validez de todo modelo es su habilidad para predecir respuestas en nuevas situaciones. En microbiología de alimentos esto significa la habilidad para generar modelos que permitan predecir el comportamiento de los microorganismos concernientes al alimento en preparaciones comerciales, almacenamiento y distribución. Claramente, la validación de este nivel debe ser realizada antes que los modelos predictivos puedan ser usados en la práctica con cierto grado de certeza. Desde el punto de vista de la seguridad de los consumidores y la aceptación de la industria, un fracaso de un modelo no validado puede representar un serio problema (Mc Meekin y col., 1993).

Draper y Smith (1981) indicaron que una vez que el modelo fue validado en la práctica es todavía necesario realizar algún procedimiento para mantener el modelo y reconocer cuando resulta obsoleto. No es un problema cuán bien un modelo puede ajustar una serie de datos, el verdadero valor de un modelo recae en cuán bien ese modelo puede predecir la respuesta microbiana bajo nuevas condiciones que no son las que fueron específicamente testeadas.

El modelado microbiano comenzó aproximadamente en 1920 con los cálculos de tiempo de muerte térmica y el uso de los valores D (tiempo de reducción decimal) y z (grados de variación de la temperatura necesarios para reducir el valor de D en un 90%) para describir la resistencia térmica bacteriana. En la década del 70 se profundizó principalmente en el modelado de la probabilidad de la producción de toxinas de *C. botulinum*. En los años 80 el marcado incremento en la incidencia de brotes de enfermedades producidas por alimentos, llevó a tomar conciencia del abastecimiento de alimentos seguros. En ese momento, los microbiólogos de alimentos comenzaban a aceptar que los métodos microbiológicos tradicionales para determinar la calidad y seguridad alimenticia, estaban limitados por el tiempo requerido para obtener los resultados y que los métodos indirectos (químicos, físicos o físico-químicos) no proporcionaban una respuesta hasta que un gran número de células se encontraba presente (Whiting y Buchanan, 1994)

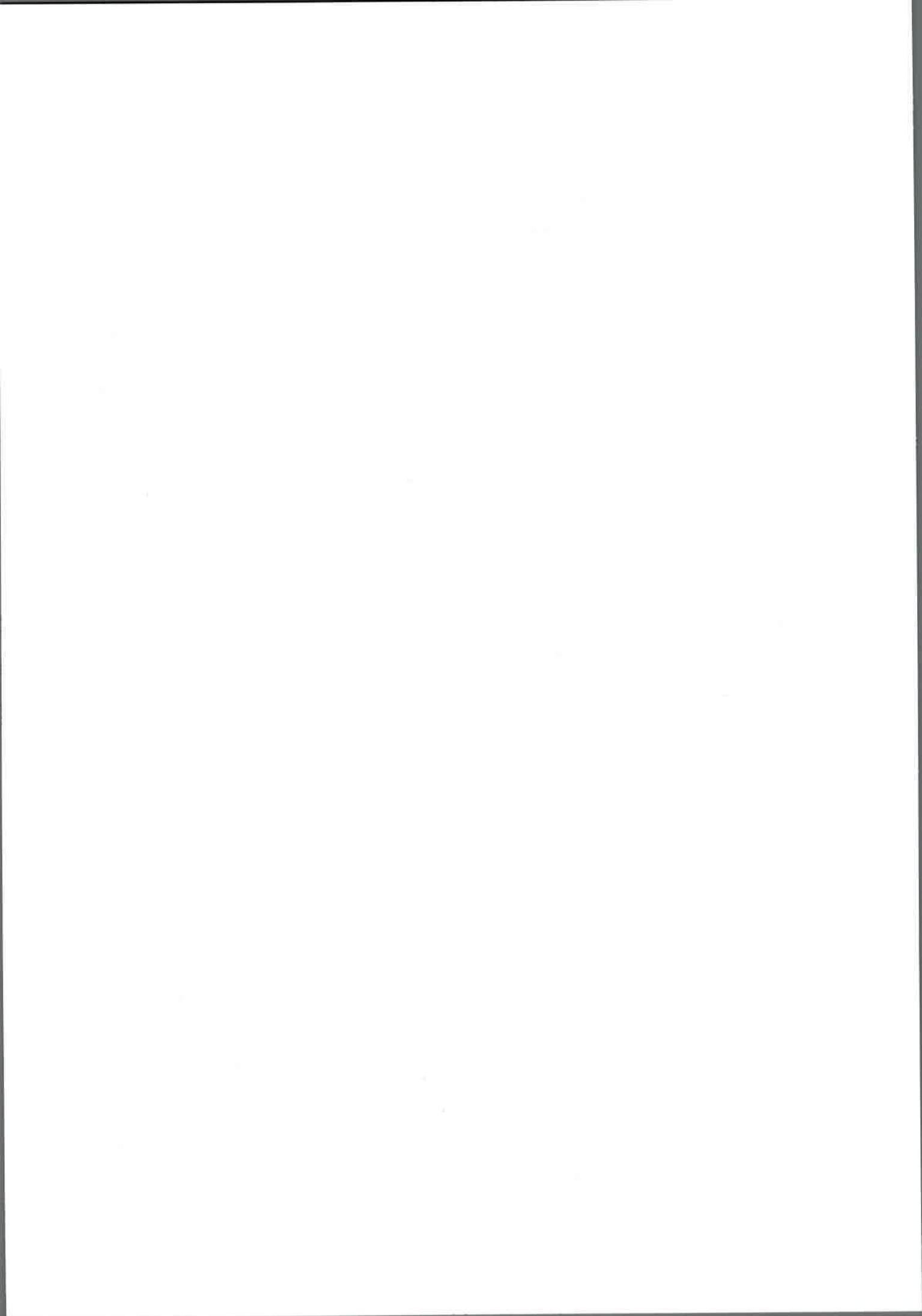
Antes del advenimiento de la microbiología predictiva, la mayor parte de la bibliografía definía las condiciones ambientales limitantes del crecimiento, cuando los demás factores ambientales se encontraban en sus valores óptimos. Además, sólo ocasionalmente los efectos de dos o más factores de conservación se estudiaban de tal forma que permitieran cuantificar la interacción de los mismos. A consecuencia de ello, muchos de estos datos no eran de utilidad o bien no permitían predecir la respuesta microbiana (Alzamora y col., 1995).

Si bien el modelado no revela comportamientos microbianos extraños o poco esperados, los modelos se pueden utilizar para predecir, por interpolación, el crecimiento bajo una combinación de condiciones que no fueron específicamente testeadas en el protocolo experimental (Whiting, 1995)

Se han propuesto varios esquemas para categorizar los modelos, uno de ellos propone dividirlos en modelos de crecimiento y modelos de inactivación/supervivencia. Dentro de cada categoría se subdividen en modelos primarios, secundarios y terciarios (Whiting y Buchanan, 1994; Alzamora y col., 1995; López-Malo, 2000; Alzamora y col., 2010).

Los modelos primarios describen cambios en la respuesta microbiana en función del tiempo en un ambiente específico. El modelo puede cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro o por gramo (ufc/mL), formación de toxinas, niveles de sustrato o productos metabólicos, absorbancia e impedancia. Una vez generada la curva de crecimiento o de muerte microbiana, se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio de la respuesta en función del tiempo. Ejemplos de modelos primarios son: la función de Gompertz para crecimiento exponencial, el modelo de Gompertz modificado para describir la inactivación microbiana; modelos para describir la declinación no lineal de esporas sobrevivientes en el tiempo; el modelo logístico aplicado a la destrucción térmica, etc. (Mc Meekin y col., 1993). El valor D (tiempo necesario a una determinada temperatura para reducir en un 90% la población microbiana es también un ejemplo de modelo primario (Whiting y Buchanan, 1994).

Los modelos secundarios describen las respuestas de los parámetros de los modelos primarios frente a cambios en uno o más factores ambientales como temperatura, pH y a_w . Ejemplos de modelos secundarios son el modelo de Arrhenius, el modelo de la raíz



cuadrada y el modelo de superficie de respuesta. El valor z utilizado en procesos térmicos es también un ejemplo de modelo secundario (Whiting y Buchanan, 1994).

Es necesario remarcar que llevando a cabo este modelado se puede describir exitosamente el comportamiento microbiano en la mayoría de los alimentos, pero hay ocasiones en las que se encuentran discrepancias entre el modelo y el crecimiento observado. Estas discrepancias son descriptas como “fallas”. Un ejemplo sería que el crecimiento observado es más lento que el predicho por el modelo (Wilson y col., 2002).

Una debilidad mayormente encontrada está dada por la severidad del medio que representa la matriz alimentaria con respecto a los medios de cultivo que se utilizan en ensayos de laboratorio (Walls y Scott, 1997).

A continuación se describe con mayor profundidad el modelo secundario utilizado en el presente trabajo.

I.11.1. Modelo secundario de superficie de respuesta (SR)

El conocimiento de los factores limitantes para el desarrollo de *Zygosaccharomyces rouxii* resulta esencial para evitar los problemas de alteraciones en los jugos de uvas concentrados (ICMSF II, 1980; Martorell y col., 2005; Martorell y col., 2007). Conociendo cuales son las condiciones propias del sustrato (pH y concentración de azúcares) en las que el producto presenta mayor estabilidad microbiológica, las empresas elaboradoras pueden fijar sus propios parámetros, extendiendo la vida útil del producto y asegurando así que el mismo llegue a destino con óptima calidad evitando rechazos de partidas.

Pocos estudios se han llevado a cabo para una mejor comprensión del efecto de algunos factores limitantes en el crecimiento de *Z. rouxii*. Todos ellos han sido realizados *in vitro* y en algunos de ellos se evaluó cada variable de forma independiente (Kalathenos y col, 1995; Praphailong y Fleet, 1997; Membre y col, 1999). Por el contrario, la metodología de superficie de respuesta (SR) es una herramienta muy útil que se ha aplicado anteriormente para estimar los efectos combinados de las variables ambientales en el crecimiento de las levaduras (D'Amato y col, 2006; Arroyo-López y col, 2006).

Esta metodología ha sido ampliamente utilizada en microbiología predictiva como un modelo polinomial secundario para predecir la respuesta del microorganismo (McMeekin y col., 1993).

Las SR son modelos completamente empíricos (ajustan los datos a la ecuación sin ninguna hipótesis previa que los explique). Son muy utilizados para ajustar datos de cinéticas de crecimiento (μ_{\max} , λ) en función de variables ambientales. Sus principales aplicaciones incluyen optimizar la respuesta del microorganismo en función de las variables evaluadas y predecir su comportamiento en función de combinaciones de las variables que originalmente no estaban incluidas en el diseño experimental. Para dos variables ambientales la ecuación que describe el modelo es la siguiente:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (4)$$

Donde,

y: es el parámetro modelado (λ , μ_{\max} , etc.)

x_1 , x_2 : son las variables ambientales (Temperatura, pH, etc.)

b_1 , b_2 : son los coeficientes a determinar (se puede determinar los efectos lineales, cuadráticos e interacciones entre las variables).

I.11.2. Fases del desarrollo del Modelo SR

I.11.2.1. Elección del diseño experimental

I.11.2.2. Modelado Primario: se determinan los parámetros de crecimiento (μ_{\max} y λ) de las levaduras para cada uno de los tratamientos incluidos en el diseño experimental. Esta tarea se lleva a cabo ajustando los datos microbianos obtenidos para cada tratamiento a las distintas ecuaciones matemáticas que representan las fases de crecimiento de las levaduras. El ajuste de los datos a las ecuaciones se lleva a cabo mediante regresión no lineal con paquetes estadísticos. La ecuación de Baranyi-Roberts es una de las más utilizadas y fue la que mejor se ajustó a los datos obtenidos en el ensayo. Esta ecuación se define por la siguiente fórmula:

$\ln N = N_0 + \mu m * A(t) - \ln \{1 + [\exp(\mu m * A(t) - 1) / \exp(N_{\infty} - N_0)]\}$, con

$$A(t) = t + (1/\mu m) \ln \{[\exp(-\mu m * t) + 1 / (\exp(\lambda * \mu m) - 1)] / [1 + (1 / (\exp(\lambda * \mu m) - 1))]\} \quad (5)$$

Donde,

N_0 : es la población inicial de levaduras.

N : es la población de levaduras en un tiempo dado.

A : es la asíntota superior cuando la población alcanza la fase estacionaria de crecimiento.

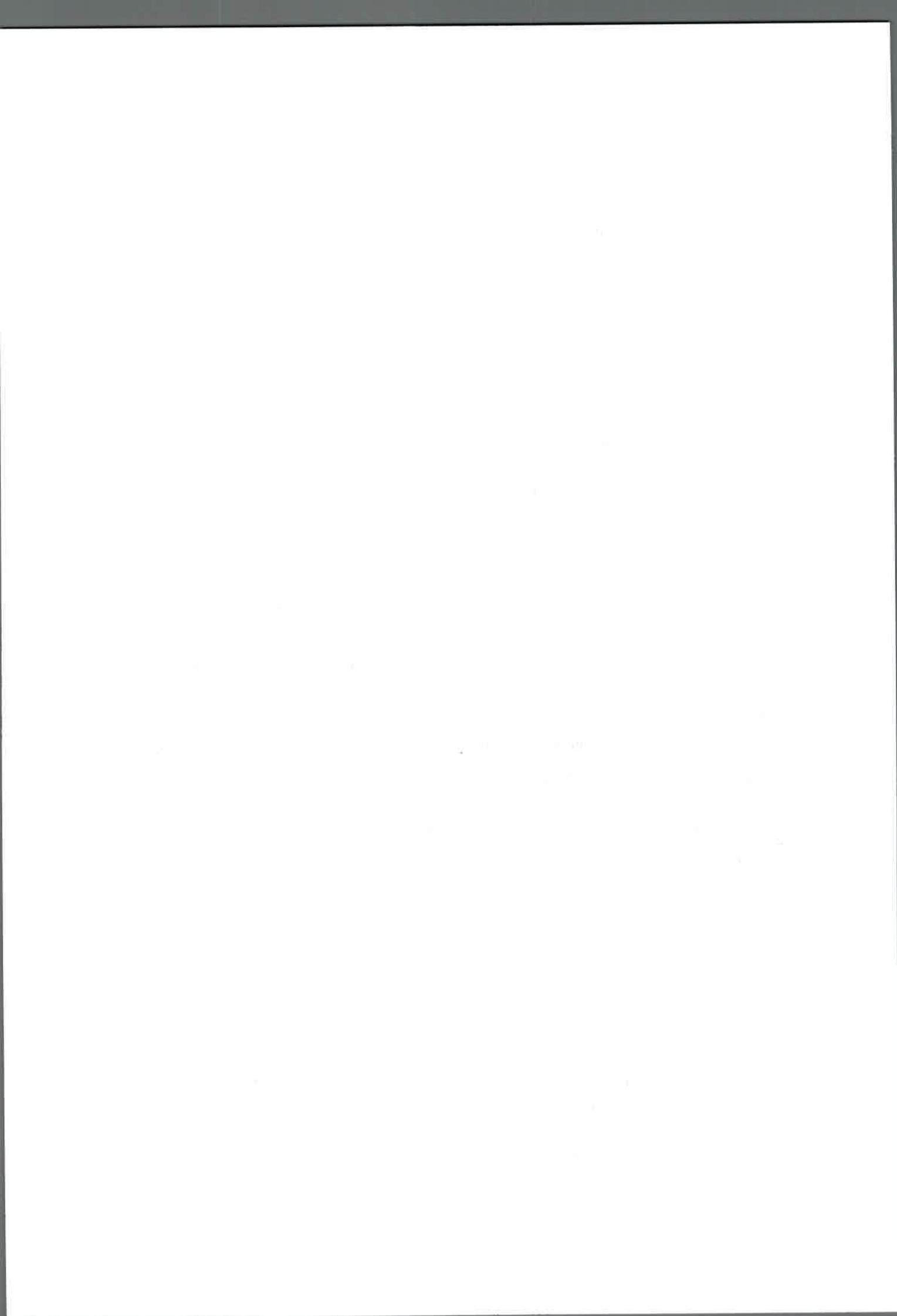
μm : velocidad máxima de crecimiento.

I.11.2.3. Modelado Secundario o Superficie de Respuesta

En esta etapa se obtienen los gráficos y se interpretan los coeficientes. De acuerdo a la ecuación (4), el principio de parsimonia y para reducir la complejidad del modelo, sólo se retienen en el modelo aquellos coeficientes que son significativos ($p \leq 0,05$) en el ajuste. Por ejemplo en la tabla I.3 se muestran los coeficientes obtenidos y solo son retenidos en el modelo aquellos resaltados en negrita para temperatura (T) y pH.

Tabla I.3. Coeficientes de regresión estimados para el efecto lineal y cuadrático de las variables temperatura y tiempo, y el efecto de la interacción entre ambas variables sobre la respuesta microbiana con sus respectivas desviaciones estandares (DS).

Coeficientes	Valor	DS
<i>Ajuste del modelo</i>	$R^2=0.854$	
β_0 (Media/Inter)	0.362	†0.001
β_1 (lineal T)	0.006	0.416
β_{11} (cuadratico T)	-0.121	†0.003
β_2 (lineal pH)	0.076	†0.006
β_{22} (cuadratico pH)	-0.024	0.072
β_3 (lineal S)	-0.006	0.396
β_{33} (cuadratico S)	-0.003	0.650
β_{12} (interaccion T*pH)	0.039	†0.040
β_{13} (interaccion T*S)	-0.011	0.296
β_{23} (interaccion pH*S)	-0.005	0.572



En algunas ocasiones es aconsejable realizar una transformación previa del parámetro modelado (\log_{10} , \log_2 , \ln , raíz cuadrada, inversa) para mejorar la calidad del ajuste.

Mirando el signo de los coeficientes podemos determinar si la correlación entre la variable ambiental y el parámetro modelado es positiva o negativa.

- Signo positivo → Correlación positiva → El parámetro aumenta con la variable.
- Signo negativo → Correlación negativa → Variable aumenta y el parámetro disminuye

Por otro lado, se puede obtener el Diagrama de Pareto (figura I.6). Por medio de este gráfico se pueden visualizar claramente y determinar los efectos de las variables ambientales con una mayor influencia sobre la respuesta microbiana, así como las interacciones entre las mismas (efectos estandarizados).

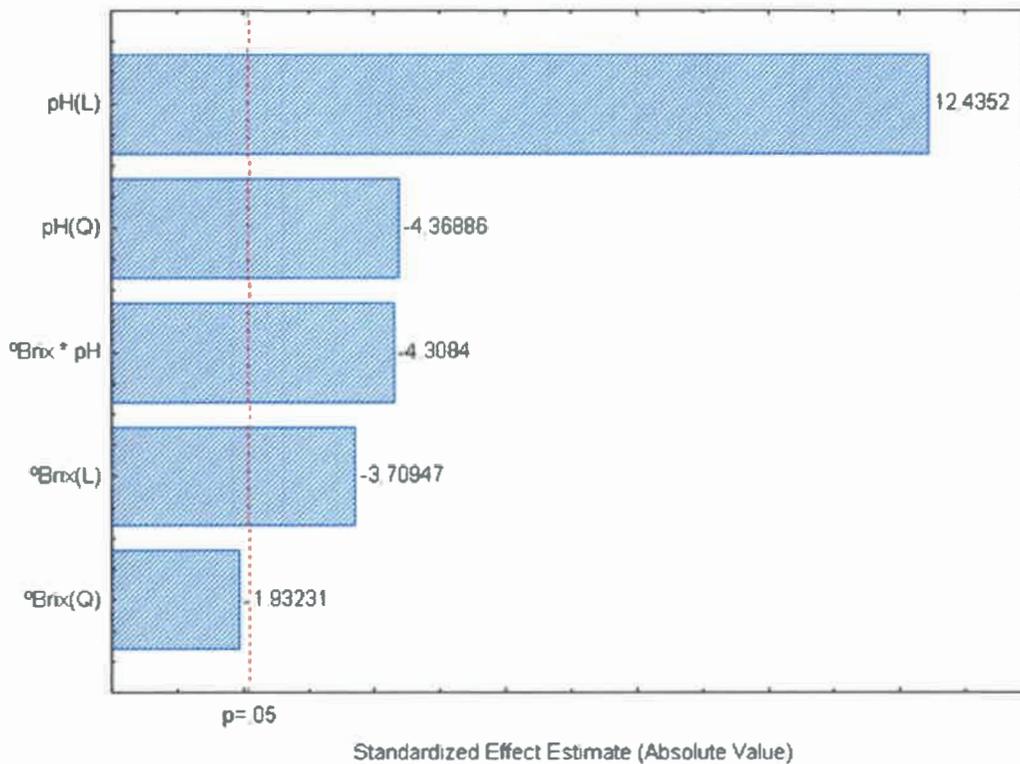


Figura I.6. Ejemplo de un diagrama de Pareto que indica que efecto lineal del pH es el que ejerce una mayor influencia sobre el crecimiento microbiano.

I.11.2.4. Predicciones

La gran utilidad de un modelo de SR es que permite realizar estimaciones de como cambios en las variables ambientales afectarán el crecimiento de la levadura.

Estas predicciones son de gran utilidad para la industria del jugo de uva concentrado y siempre se deben de llevar a cabo dentro de los límites establecidos por el diseño experimental, evitando hacer extrapolaciones fuera del mismo.

Las predicciones siempre deben de llevar un error asociado (incertidumbre) que el programa estadístico determina y que es muy importante a la hora de la toma de decisiones. Sin embargo, el usuario también puede construir su ecuación de predicción sustituyendo los coeficientes significativos en la ecuación general e introduciendo luego los valores de las variables ambientales que se deseen.

De todas formas, cuando el alimento presenta una elevada población microbiana, el ajuste de estas variables ambientales no es suficiente para asegurar su estabilidad microbiana y extender su vida útil. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de otras herramientas tecnológicas para obtener una reducción de esta población microbiana, sin afectar a las características organolépticas del producto. En nuestro trabajo nos referimos a las características del jugo de uva concentrado y su principal levadura contaminante *Z. rouxii*. Debido a las características de este producto solo algunos métodos de conservación pueden utilizarse, tales como almacenamiento a bajas temperaturas, pasteurización o el agregado de conservantes permitidos.

I.12. Tecnologías físicas y químicas para la conservación de jugos de uva concentrados

I.12.1. Pasteurización

Se cree que la destrucción de los microorganismos por el calor es consecuencia de la desnaturalización de sus proteínas y sobre todo de la inactivación de las enzimas que necesitan para desarrollar sus actividades metabólicas. Pero, existen diferentes procesos biológicos que pueden llevar a la muerte de una célula o iniciar una cascada de procesos que desencadenan la inactivación de las células. Durante un tratamiento térmico, es

razonable asumir que dos o más de estos procesos pueden proceder simultánea o interactivamente para causar la muerte de las células o esporas (Peleg, 2006).

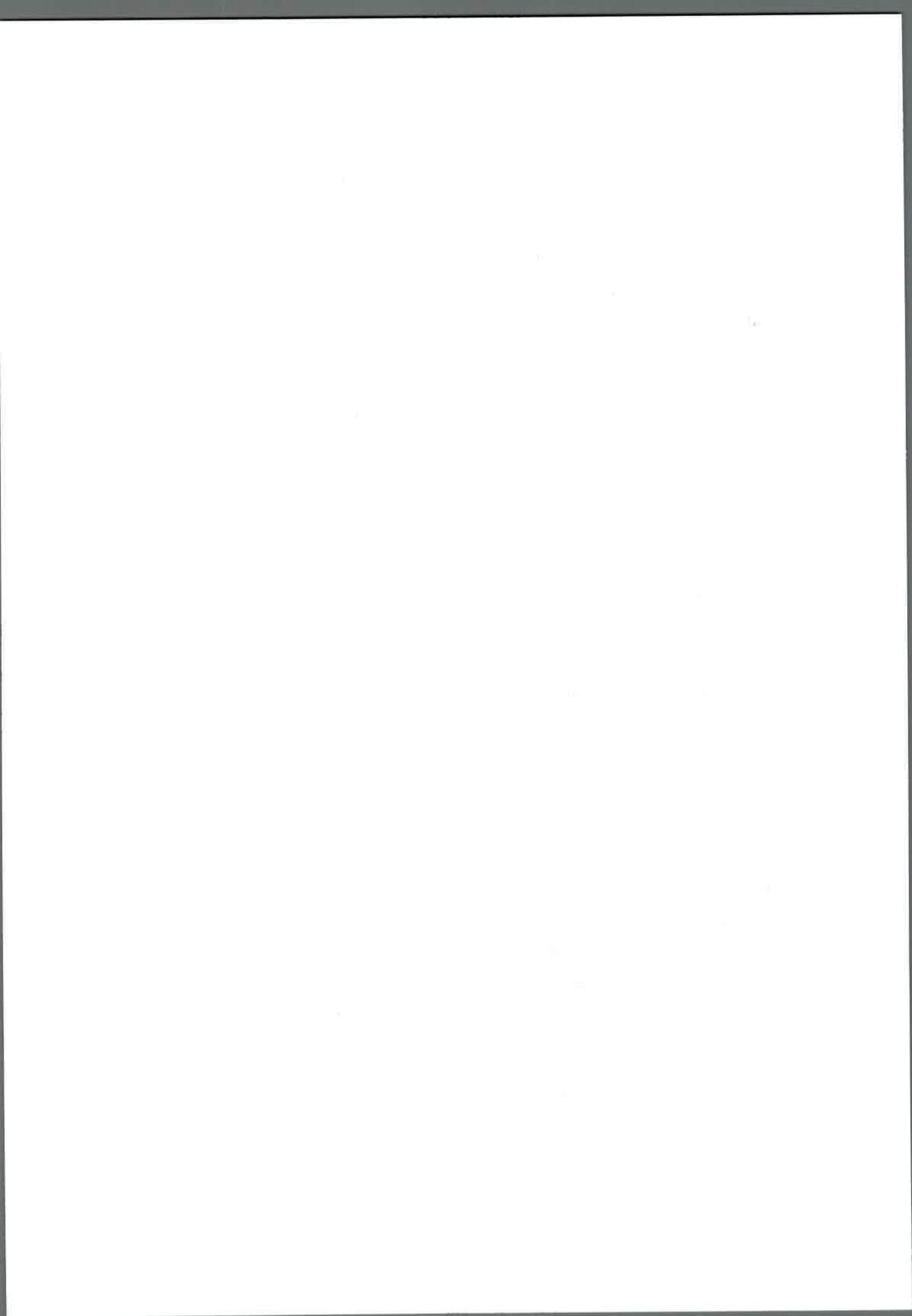
La intensidad del tratamiento térmico necesaria para destruir los microorganismos o sus esporas depende de la especie de microorganismo, de su estado fisiológico, y de las condiciones del medio en el momento de efectuar el tratamiento. Según el tratamiento térmico que se emplee, es posible que se destruyan sólo algunas células vegetativas, la mayoría de las células o todas las células, parte de las esporas bacterianas o la totalidad de las mismas. El tratamiento térmico elegido dependerá de las especies de microorganismos que sea preciso destruir, de otros procedimientos de conservación que sea preciso emplear, y del efecto que produzca el calor en el alimento (Frazier y Westhoff, 1993).

La pasteurización es un tratamiento de calor suave usado para reducir el número de microorganismos vivos en el alimento de manera que se pueda extender su vida útil. La eficiencia de este proceso dependerá de la carga microbiana inicial, de la termo-resistencia del microorganismo y de las características del sustrato; por lo tanto el producto no siempre alcanza la esterilidad pudiendo los microorganismos crecer nuevamente y conducir a la alteración del alimento (Deák, 2008).

I.12.1.1. Termo-resistencia

Tanto las células como las esporas de los microorganismos difieren mucho en cuanto a su resistencia a las temperaturas elevadas. Algunas de estas diferencias son debidas a factores que pueden ser controlados, aunque otras son propias de los microorganismos y no siempre pueden ser explicadas. Las distintas condiciones del medio pueden favorecer el crecimiento de una parte de la población y, mediante selección, se pueden originar cultivos cuyas células poseen una termo-resistencia mayor o menor que la habitual. Se conocen algunos factores que determinarán la eficiencia del tratamiento térmico (Bean, 1983; Ball y Olson, 1957). Los principales factores conocidos son los siguientes:

- *La relación tiempo-temperatura.* Bajo una determinada serie de condiciones dadas, el tiempo necesario para destruir las células vegetativas o las esporas disminuye conforme aumenta la temperatura.



- *La concentración inicial de esporas (o de células vegetativas).* Cuanto mayor es el número de esporas o células existentes, más intenso es el tratamiento necesario para su total destrucción.
- *Las características de las células vegetativas o de las esporas.* Su grado de termo-resistencia será influido tanto por las condiciones del medio bajo las cuales han crecido las células, o se han originado las esporas, como por su tratamiento posterior.
- *El medio de cultivo.* El medio en el que tiene lugar el crecimiento tiene una extraordinaria importancia. La influencia que ejercen los nutrientes del medio, su tipo, y su concentración, será distinta para cada microorganismo, aunque, en general, cuanto más rico es el medio de crecimiento tanto más termo-resistentes son las células vegetativas o las esporas. La existencia en el medio de un aporte apropiado de factores de crecimiento suele favorecer la aparición de células o de esporas termo-resistentes.
- *La fase de crecimiento.* La termo-resistencia de las células vegetativas depende de la fase de crecimiento en que se encuentran, mientras que la de las esporas depende de su edad. La termo-resistencia de las células vegetativas es máxima en la etapa final de la fase lag, siendo también casi tan elevada durante la fase estacionaria, teniendo lugar a continuación una disminución de la misma. Durante la fase de crecimiento logarítmico, las células vegetativas son menos termo-resistentes. Las esporas muy jóvenes (inmaduras) son menos resistentes que las maduras.
- *La composición del sustrato en el cual se encuentran las células vegetativas o las esporas, al someterlas a tratamiento térmico.* El sustrato en el cual se encuentran las células vegetativas o las esporas cuando son sometidas a tratamiento térmico tiene tanta importancia que, el tiempo de muerte térmica calculado siempre debe indicar en qué sustrato fue obtenido.
- *La concentración de iones hidrógeno (pH).* En general, tanto las células vegetativas como las esporas son más termo-resistentes cuando se encuentran en un sustrato neutro o próximo a la neutralidad. Un aumento, tanto de la acidez

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that proper record-keeping is essential for transparency and accountability, particularly in financial matters. This section outlines the various methods and tools used to collect and analyze data, ensuring that the information is reliable and up-to-date.

2. The second part of the document focuses on the implementation of these practices across different departments and projects. It provides detailed instructions on how to integrate record-keeping into existing workflows, ensuring that it does not become a burden but rather a streamlined part of the process. This includes identifying key personnel responsible for data collection and analysis, as well as establishing clear communication channels for reporting and feedback.

3. The third part of the document addresses the challenges and potential pitfalls associated with record-keeping. It discusses common issues such as data inconsistency, incomplete records, and the risk of information loss. To mitigate these risks, the document offers practical solutions and best practices, such as regular audits, data validation checks, and the use of secure storage systems. It also highlights the importance of training and ongoing support for staff involved in the process.

4. The final part of the document summarizes the key findings and recommendations. It reiterates the significance of accurate record-keeping for organizational success and provides a clear action plan for the future. This includes setting specific goals, timelines, and metrics to track progress, as well as identifying areas for further research and improvement. The document concludes by expressing confidence in the ability of the organization to implement these practices effectively and achieve its objectives.

como de la alcalinidad acelera su destrucción por el calor, si bien una desviación del pH hacia la acidez es más eficaz que un aumento de igual valor de la alcalinidad. La influencia del pH del sustrato se complica por el hecho de que el tratamiento térmico a temperatura elevada provoca una disminución del pH en los alimentos de acidez baja y media; y cuanto mayor es el pH inicial del alimento, tanto mayor es el descenso del pH provocado por el calentamiento.

- *Otros componentes del sustrato.* Parece ser que el azúcar protege a algunos microorganismos y a algunas esporas, pero no a la totalidad de ambas formas microbianas. La concentración óptima que ejerce esta protección es distinta para cada microorganismo: es elevada para algunos microorganismos osmófilos, mientras que para otros es baja, es elevada para las esporas, y es baja para las células vegetativas no osmófilas. Es posible que la acción protectora del azúcar esté relacionada con la disminución de la a_w resultante. La disminución de la a_w ocasiona un aumento de la termo-resistencia (Ball y Olson, 1957; Bean, 1983).

I.12.1.2. Termo-resistencia en levaduras

La termo-resistencia de las levaduras y de sus esporas al calor húmedo depende de la especie e incluso de la cepa y, naturalmente, del sustrato en el cual se someten al calentamiento. En general, para destruir las ascosporas de las levaduras sólo son necesarios de 5 a 10°C de temperatura por encima de la temperatura necesaria para destruir las células vegetativas. La mayoría de las ascosporas son destruidas por una temperatura de 60°C actuando durante un tiempo de 10 a 15 minutos; algunas son más resistentes, aunque ninguna es capaz de resistir, ni siquiera durante un corto periodo de tiempo, un calentamiento a 100°C. Las células vegetativas de las levaduras suelen ser destruidas por temperaturas comprendidas entre 50 y 58°C en un tiempo de 10 a 15 minutos. Tanto las levaduras como sus esporas, son destruidas por los tratamientos de pasteurización a los que se somete la leche (62,8°C durante 30 minutos o 71,7°C durante 15 segundos), siendo ésta la razón de que las levaduras se destruyan durante la cocción del pan, en cuyo interior la temperatura alcanza aproximadamente 97°C (Ball y Olson, 1957; Bean, 1983).

I.12.1.3. Modelos predictivos en procesos de inactivación térmica

De acuerdo con la mayoría de los textos de microbiología de alimentos, la inactivación térmica de microorganismos es un proceso que sigue una cinética de primer orden. Esta teoría se basa en que bajo la exposición a una temperatura letal uniforme, el número de células o esporas decrece exponencialmente con el tiempo. O dicho de otra forma, la velocidad de inactivación es proporcional al número de células que aún permanecen vivas (Peleg, 2006). En las cinéticas de primer orden el gráfico de logaritmo de células supervivientes vs tiempo debe ser una línea recta. Este hecho es un tema debatible en la práctica, evidencias crecientes sugieren que las curvas log lineal de supervivencia vs tiempo son más una excepción que una regla (van Boeckel, 2002). Este tipo de curva supone, que todos los organismos son idénticos y son expuestos a una temperatura letal uniforme y se inactivarían todas simultáneamente. Es conocido que, aun adaptando los métodos de ensayo para que la temperatura sea lo más uniforme posible, esto no es real, y además no todas las células son iguales respecto a su termo-resistencia. En una población microbiana existe un amplio rango de termo-resistencias.

Por otro lado, para modelar curvas que no son log lineales, se han propuesto numerosos modelos primarios (Coroller y col., 2006). Se ha sugerido que la mayoría de las curvas de supervivencia semilogarítmicas que presentan una curvatura con una concavidad superior son evidencia que la población afectada es una mezcla de dos o más subpoblaciones cuya mortalidad sigue una cinética de primer orden diferente, es decir presentan una velocidad constante k en cada fracción (Geeraerd y col., 2000). Cerf (1977) fue el primero que propuso un modelo basado en esta hipótesis de la coexistencia de dos subpoblaciones con diferentes resistencias al estrés que siguen un decrecimiento logarítmico lineal. Siguiendo este razonamiento, la curva de muerte de ciertos microorganismos puede describirse por un modelo doble exponencial. Esto es conocido como Modelo Bifásico. El modelo bifásico presenta la siguiente ecuación:

$$\log_{10}(N)=\log_{10}(N_0)+\log_{10}(f*e^{-k_{max1}*t}+(1-f)*e^{-k_{max2}*t}) \quad (6)$$

Donde,

N: es la población de sobrevivientes en un tiempo dado

N₀: es la población inicial

k_{max1}: es la pendiente en la primera fase de la curva

k_{max2}: es la pendiente en la segunda fase de la curva

t: tiempo

f: es la fracción de la población original en el grupo mayor

Existen otros modelos para explicar estos comportamientos como el Modelo de Weibull que ha sido ampliamente utilizado para describir curvas logarítmicas no lineales en tratamientos de inactivación térmica y no térmica. Este modelo se basa en la hipótesis de que la resistencia al estrés de una población sigue una distribución de Weibull (Coroller y col., 2006). Según la distribución de Weibull, la inactivación microbiana puede ser entendida como un fenómeno de falla, es decir la falla de un organismo para resistir condiciones estresantes durante un cierto tiempo. Este fenómeno de falla, donde una fracción de supervivientes progresivamente decrece, se encuentra aplicado en numerosos campos científicos no necesariamente microbiológicos. El modelo matemático que describe este proceso, es denominado distribución de Weibull y es una variante de la distribución exponencial. La ventaja de este modelo es su simplicidad matemática y su flexibilidad. A pesar de su amplia versatilidad, este modelo puede no ser útil en curvas con largas colas que presentan sobrevivientes aun en largos tratamientos o curvas sigmoideas (con hombro y cola). Por ello Coroller y colaboradores (2006) proponen una modificación del modelo de Weibull el cual contempla la presencia de dos subpoblaciones con diferente resistencia al estrés. La modificación propuesta parte del supuesto que cuando una población puede ser enumerada a bajas concentraciones, la parte derecha de la curva corresponde a la subpoblación más resistente (subpoblación 2) y su forma se parece a la subpoblación más sensible (subpoblación 1). Bajo esta asunción propone aplicar el mismo parámetro de forma a las dos subpoblaciones (p) para poder simplificarla. El modelo se denomina Doble Weibull Simplificado (Coroller y col., 2006) y presenta la siguiente ecuación:

$$\text{Log } N_t = \text{Log}\{(N_0/(1+10\alpha))^*[10\alpha-(t/\delta_1)^p+10-(t/\delta_2)^p]\} \quad (7)$$

Donde,

N_t : es la población de sobrevivientes en un tiempo dado

N_0 : es la población inicial

p : es el parámetro de forma (donde $p > 1$ para las curvas convexas bifásicas no lineales y $p = 1$ para las curvas bifásicas lineales y $p < 1$ para curvas cóncavas bifásicas no lineales)

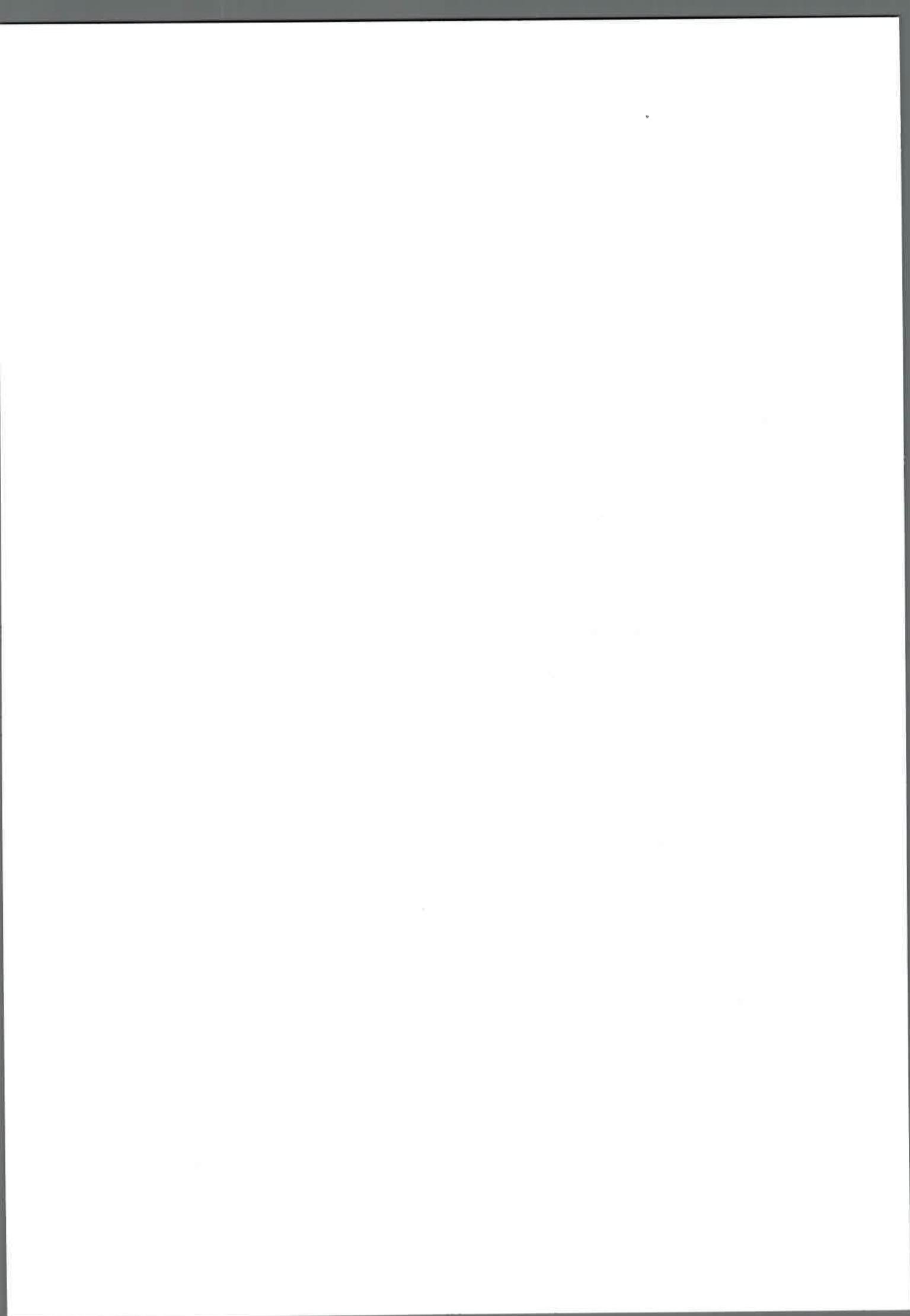
δ : es el tiempo para la primera reducción decimal (los subíndices 1 y 2 indican dos subpoblaciones diferentes donde la subpoblación 1 es más sensible que la subpoblación 2 por lo tanto $\delta_1 < \delta_2$).

α : es el parámetro que incluye la relación de las fracciones de cada subpoblación y es un derivado del parámetro f originalmente propuesto para el modelo de Weibull. Los valores para α varían entre 4 y 6.

t : tiempo

1.12.2. Conservantes químicos

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud: “Un aditivo alimentario es una sustancia, o mezcla de sustancias, distinta a la materia prima básica del alimento, que se encuentra en éste como resultado de cualquier fase de su producción, de su tratamiento, de su almacenamiento o de su envasado. Este término no incluye la contingencia de su contaminación” (OMS, 1965). Esta definición pone en evidencia la única interpretación de todo aditivo alimentario; es decir, que se trata de una sustancia añadida al alimento de forma intencionada. A aquellos aditivos alimentarios que se añaden a los alimentos concretamente para evitar que se alteren o que se contaminen, se les ha dado la denominación de conservantes químicos. Ciertas alteraciones de los alimentos pueden ser ocasionadas por microorganismos, por enzimas, o por reacciones puramente químicas. La inhibición de la multiplicación y de la actividad de los microorganismos es uno de los principales objetivos del empleo de conservantes químicos. Los conservantes pueden inhibir a los microorganismos por dañar su membrana celular, o por obstaculizar la actividad de sus enzimas o sus mecanismos genéticos. Otros conservantes se pueden emplear como antioxidantes con el fin de impedir la oxidación de las grasas insaturadas, como neutralizadores de la acidez, como estabilizadores con el fin de evitar modificaciones físicas, como agentes para dar



consistencia a los alimentos, y como revestimiento o envoltura con el fin de mantener a los alimentos exentos de microorganismos, para evitar que pierdan agua, o con el fin de impedir reacciones microbianas, enzimáticas y químicas indeseables (Frazier y Westhoff, 1993).

Además de los compuestos químicos que se añaden a los alimentos de forma intencionada y de los que se colocan sobre su superficie o se emplean para envolverlos con el fin de contribuir a que se conserven, existen muchos otros compuestos químicos que llegan a los alimentos durante su producción, durante su tratamiento o durante su envasado. Es probable que sean transferidos a los alimentos residuos de pesticidas, de herbicidas y de fungicidas cuando se trata de frutas y hortalizas; residuos de los detergentes utilizados para lavar los alimentos; y residuos de los desinfectantes empleados en los utensilios y equipamiento (Hidalgo Togores, 2002).

Los factores que influyen en la eficacia de los conservantes químicos para destruir los microorganismos o para inhibir tanto su multiplicación como su actividad metabólica, son (1) la concentración de la sustancia química empleada, (2) la especie, número y las características de los microorganismos existentes en el alimento, (3) la temperatura, (4) momento en el cual se añade el conservante al alimento, y (5) las propiedades químicas y físicas del sustrato en el cual se encuentran los microorganismos (humedad, pH, clase y concentración de solutos, tensión superficial, y existencia de coloides y otras sustancias protectoras). Un determinado agente químico puede ser fungicida a una determinada concentración, solamente inhibidor a una concentración más baja, o no ejercer ningún efecto a diluciones todavía mayores (Frazier y Westhoff, 1993).

Los conservantes químicos, tanto si se emplean solos como si se emplean junto con otros sistemas de conservación, tienen por objeto mantener el estado original de los alimentos y evitar las pérdidas excesivas debidas a su alteración. Un conservante químico debería tener una actividad antimicrobiana de amplio espectro; no debería ser tóxico para las personas ni para los animales; no debería influir en el sabor, en la palatabilidad ni en el aroma del alimento original; no debería ser inactivado por el alimento ni por ninguna sustancia existente en el mismo; no debería estimular la aparición de cepas de microorganismos resistentes; y, preferentemente debería destruir los microorganismos en lugar de inhibirlos (Frazier y Westhoff, 1993).

La producción de jugo de uva concentrado no se rige por el Código Alimentario Argentino sino que responde a la normativa del INV donde está explícitamente permitido solo la adición de unos pocos conservantes como SO_2 , ácido sórbico, ácido cítrico y ácido láctico, para preservar las características naturales del sustrato (INV, 2011).

La adición de conservantes en los alimentos es una práctica muy utilizada durante siglos. Los conservantes de alimentos más utilizados son ácidos débiles, tales como ácido sórbico, ácido benzoico, ácido propiónico y ácido acético, y además el dióxido de azufre, algunos de los cuales se encuentran naturalmente en los alimentos como frutas y verduras (Piper, 2011). Los ácidos débiles se utilizan ampliamente en alimentos que contienen altas concentraciones de azúcar y bajo pH, tales como jugos de fruta, bebidas, vinos, en los que la alteración es más a menudo causada por levaduras, hongos filamentosos y bacterias lácticas (Beuchat, 1982; Vermeulen y col., 2008). El metabolismo de las levaduras y la resistencia a mencionados conservantes químicos, plantea problemas para la industria alimenticia lo que genera la necesidad de aumentar los niveles de conservantes empleados en los alimentos de bajo pH para prevenir su alteración (Piper, 2011).

El dimetildicarbonato (DMDC) es un conservante químico que ha sido recientemente aprobado para el control de las levaduras que producen defectos en los vinos (Martorell y col., 2007; OIV, 2013). Más de 400 mg/L de DMDC es necesario para inhibir la fermentación alcohólica llevada a cabo por diferentes especies de levaduras (Delfini y col., 2002; Costa y col., 2008). Renouf y col. (2008) han sugerido que el DMDC no debe ser utilizado como agente de prevención sino sólo como agente esterilizante contra las poblaciones no deseadas presentes en el vino.

En la actualidad, hay una tendencia del consumidor de ingerir alimentos más naturales, mínimamente procesados y sin conservantes, sin que estos dejen de ser seguros y con una vida útil prolongada. Esto, junto con una legislación más estricta en relación a los conservantes ha desafiado a la industria alimenticia y ha dado lugar a un aumento de la investigación y el uso de antimicrobianos "derivados naturalmente". En las últimas dos décadas, otros agentes de conservación de origen microbiano, vegetal y animal, han sido intensamente estudiados para aplicaciones prácticas (Pozo- Bayon y col., 2012).

La vainillina (4 -hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el principal constituyente de las vainas de vainilla y es un compuesto aromatizante principalmente usado en alimentos tales como helados, chocolates y productos de confitería. Por otra parte, informes recientes han demostrado que la vainillina es capaz de inhibir el desarrollo de hongos filamentosos y levaduras en los purés de frutas y agar base de frutas (López -Malo y col., 1995, 1998). Otros estudios han demostrado la aplicación potencial de extracto fenólico de la vainillina como agente antimicrobiano y antioxidante para evitar deterioro de los alimentos y prolongar su vida útil (García Ruiz y col., 2012).

Los ácidos hidroxicinámicos (AHCs) son componentes endógenos de la uva y se consideran conservantes naturales de ciertos alimentos (Smid y Gorris 1999; Ou y Kwok, 2004). Los AHCs más abundantes en las uvas son el ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico, en orden decreciente (Flanzy, 2000). Los AHCs han sido estudiados para inhibir el crecimiento de una variedad de microorganismos, incluyendo hongos y bacterias (Van Sumere y col., 1971; Ravn y col., 1989 ; Stead y col., 1993 ; Campos y col., 2003 ; Walker y col., 2003). El crecimiento de diferentes especies de levaduras es inhibido por los AHCs en concentraciones de más de 1 mM, siendo los ácidos ferúlico y p-cumárico generalmente los que tienen mayor actividad inhibitoria (Ou y Kwok 2004; Harris y col., 2010; Pastorkova y col., 2013).

I.13. Gestión de la calidad e inocuidad de los alimentos

Durante las operaciones de preparación, tratamiento y envasado de los productos alimenticios en una planta de fabricación, las prácticas higiénicas, la limpieza y saneamiento generales de las instalaciones, y la salud de los operarios, están a cargo del inspector de sanidad de la industria alimentaria (Frazier y Westhoff, 1993). Sus obligaciones específicas en relación con los productos alimenticios pueden comprender: el control de calidad y el almacenamiento de los alimentos frescos; el abastecimiento de un suministro de agua que reúna buenas condiciones; evitar la contaminación de los alimentos por el equipo, por el personal, y por animales dañinos, durante todas las fases de las operaciones de tratamiento; y la supervisión del envasado y almacenamiento de los productos terminados. La supervisión de la limpieza y saneamiento de la planta consiste no sólo en mantener limpias y saneadas las superficies de todos los equipos que tienen contacto con los alimentos, sino también en el cuidado del interior de la planta y

de sus alrededores, y en el tratamiento y eliminación adecuados de los residuos. Las obligaciones que afectan a la salud de los operarios incluyen el suministro de agua potable, la supervisión del material de higiene personal, la regulación de las condiciones sanitarias en la planta y en sus dependencias, iluminación, calefacción y ventilación de la planta. El inspector de sanidad también puede participar en la enseñanza de las prácticas de higiene a los empleados. Los inspectores sanitarios se preocupan, principalmente, de los aspectos generales del saneamiento realizando inspecciones, consultando con el personal responsable y con los ejecutivos que dirigen este trabajo los detalles del saneamiento, e instruyendo al personal en prácticas de saneamiento. Pueden estar relacionados, o no, con el laboratorio de la planta (Frazier y Westhoff, 1993).

I.13.1. Análisis de riesgo. Puntos críticos de control (HACCP)

El comercio internacional de productos alimenticios en todas las esferas de la sociedad va en aumento proporcionando beneficios sociales y económicos. Los hábitos de consumo también han sufrido cambios importantes en las últimas décadas, y en consecuencia se han perfeccionado nuevas técnicas de producción, preparación y distribución de alimentos. Por consiguiente, es imprescindible un control eficaz de la higiene a fin de evitar las consecuencias perjudiciales que derivan de las enfermedades y los daños provocados por los alimentos y por el deterioro de los mismos, tanto para la salud como para la economía (Astiasarán y Martínez, 2000).

Frente a los aspectos de calidad e inocuidad de los alimentos, conviven actualmente dos filosofías que han determinado los cambios más importantes en las industrias alimenticias: el control total de la calidad (*Total Quality Management*, TQM) y el sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control (*Hazard Analysis and Critical Control Points*, HACCP) que resultan de suma importancia para los procesadores de alimentos en el mundo actual (FAO/OMS, 1993).

El sistema HACCP es un procedimiento que tiene como propósito mejorar la inocuidad de los alimentos ayudando a evitar que peligros microbiológicos o de cualquier tipo, pongan en riesgo la salud del consumidor. La versatilidad del sistema al permitir aplicar sus principios a diversas condiciones que pueden ir desde un proceso industrial hasta uno artesanal, marca otra de las diferencias con otros sistemas de aseguramiento de calidad. Las tendencias actuales en el enfoque para conseguir la inocuidad de los

alimentos muestran un escenario propicio para ampliar el uso del sistema HACCP como instrumento versátil que permite su aplicación en los diferentes eslabones de la cadena alimentaria. Para aplicar HACCP a cualquier actividad de la cadena alimentaria, el sector deberá estar funcionando de acuerdo a los principios generales de higiene de los alimentos del *Codex* pertinentes y la legislación correspondiente en materia de inocuidad en los alimentos (FAO/OMS, 1993).

La Comisión del *Codex Alimentarius* fue creada en 1963 por la FAO y la OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados tales como códigos bajo el programa conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias.

Cuando se identifiquen y analicen los peligros y se efectúen las operaciones consecuentes para elaborar y aplicar sistemas HACCP deberán tenerse en cuenta la composición de la materia prima, los ingredientes, las prácticas de fabricación, los procesos de fabricación, el uso final del producto, las categorías de consumidores afectadas y las pruebas epidemiológicas relativas a la inocuidad de los alimentos. La finalidad del sistema HACCP es lograr que el control se concentre en los puntos críticos. En el caso que se identifique un peligro pero no se encuentre ningún punto crítico de control, deberá considerarse la posibilidad de formular de nuevo la operación. Cuando se introduzca alguna modificación en el producto, el proceso o en cualquier fase, será necesario examinar la aplicación del sistema HACCP y realizar los cambios necesarios. Es importante que el sistema se aplique de modo flexible, teniendo en cuenta el carácter y la amplitud de cada operación (FAO/ OMS, 1993).

El sistema HACCP, que para nuestro país es una decisión voluntaria del productor, cuenta con pre-requisitos que son de cumplimiento obligatorio: (1) Buenas prácticas de manufactura (BMP) y (2) procedimientos estándares de operación sanitaria (POES). En ambos pre-requisitos se incluyen: emplazamiento de la planta, diseño higiénico de las instalaciones, diseño del flujo operacional, mantenimiento de las instalaciones, diseño y mantenimiento higiénico de los equipos, provisión de agua potable, higiene de la materia prima, higiene de las operaciones, higiene durante el transporte, disposición adecuada de los productos de desecho, control de plagas, manejo de sustancias tóxicas y productos químicos, higiene personal, capacitación del personal de todos los niveles,

rotulación e información al consumidor (Reglamento Buenas Prácticas de Manufactura, 1997).

El primer paso para la implementación de estas normas es la determinación de los puntos de contaminación microbiana, que definirán los puntos críticos de control para el establecimiento de medidas preventivas y correctivas; es por esto que nuestro trabajo contribuiría a generar el conocimiento para la implementación de normas de calidad microbiológica en la industria del jugo de uva concentrado.

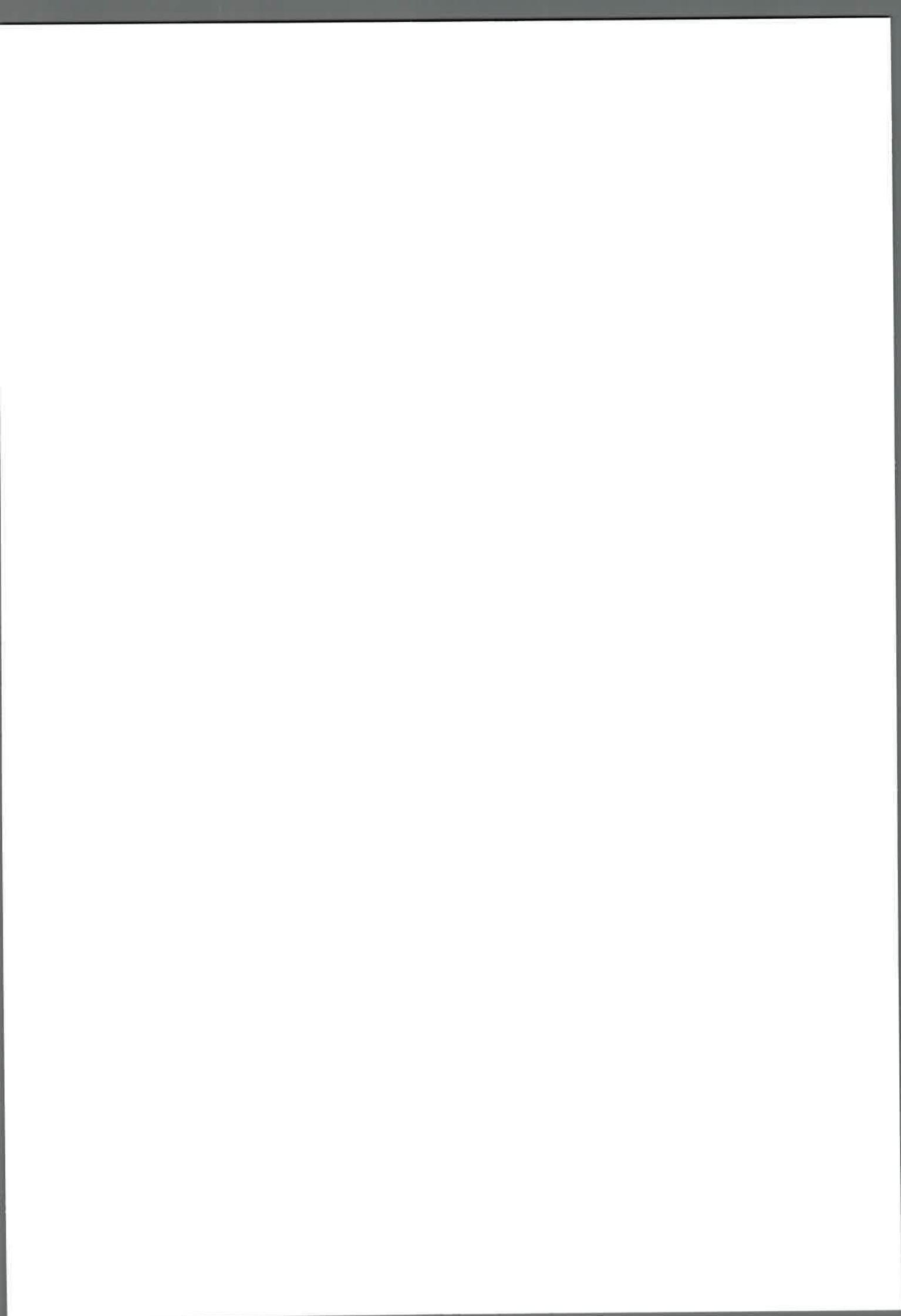
I.14. Fundamento de la investigación

En el marco de una creciente demanda mundial de jugos de fruta, Mendoza es la principal provincia productora y exportadora de jugo de uva concentrado. La mayoría de las empresas elaboran respondiendo a especificaciones fijadas por los mercados compradores. Por otro lado, el Plan Estratégico Vitivinícola 2020 (PEVI 2004) ha realizado un análisis de la cadena vitivinícola, remarcando como una oportunidad la creciente demanda mundial de jugos de fruta (específicamente de uva) y de productos naturales. La cadena de valor vitivinícola sigue consolidándose, ya que los productores de jugo de uva concentrado han comenzado a trabajar en el diseño de su propio plan estratégico. El jugo de uva concentrado no está exento de presentar problemas por microorganismos que deterioran la calidad del mismo. Existen muy escasos estudios sobre la microbiología del jugo de uva concentrado y el desarrollo de herramientas tecnológicas para prolongar su vida útil. Por lo tanto, es importante identificar las principales levaduras responsables de la alteración del jugo de uva concentrado y encontrar la combinación de variables intrínsecas de este sustrato que resulte más restrictiva para el crecimiento de las levaduras osmófilas prolongando así su vida útil. Por otro lado, evaluar tecnologías como la pasteurización y el agregado de conservantes químicos para disminuir las poblaciones de microorganismos alteradores, lo que permitirá a las empresas elaboradoras asegurar que el producto llegue a destino con óptima calidad y evitar rechazos de partidas por alteración microbiana. Además, es importante identificar en qué etapa del proceso se producen las contaminaciones con levaduras osmófilas contribuyendo a la elaboración de un adecuado programa de calidad para esta industria.

I.15. Objetivo General

- ✓ Generar el conocimiento necesario para aumentar la estabilidad microbiológica de jugos de uva concentrados producidos en Argentina y aportar una base para la implementación de normas de calidad en esta industria.

Capítulo II



Capítulo II: “Aislamiento, identificación y caracterización de levaduras osmófilas de jugos de uva concentrados de Argentina”

II.1. Hipótesis

- ✓ Los microorganismos aislados de jugos de uva concentrados corresponden a especies de levaduras osmotolerantes y osmófilas capaces de crecer en condiciones restrictivas de bajo pH y elevada concentración de azúcares.
- ✓ Las levaduras osmófilas aisladas e identificadas presentan diferentes capacidades para desarrollarse en el jugo de uva concentrado.

II.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar y caracterizar levaduras a partir de muestras de jugos de uva concentrados provenientes de distintas plantas concentradoras de Argentina.
- ✓ Seleccionar las cepas de *Zygosaccharomyces rouxii* mejor adaptadas para crecer en jugos de uva concentrados para ensayos de estimación de vida útil.

II.3. Materiales y Métodos

II.3.1. Identificación y caracterización de levaduras aisladas de jugos de uva concentrados.

Siete levaduras previamente aisladas de jugos de uva concentrados provenientes de diferentes plantas concentradoras de San Juan y Mendoza fueron identificadas por métodos moleculares mediante la aplicación de la técnica de secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S (Valente y col., 1999).

Para la extracción del ADN genómico de las levaduras se utilizó la técnica modificada de Hoffman y Wiston (1987) que consiste en una ruptura celular mediante lisis química/mecánica de las células, seguido de una purificación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con etanol absoluto. Para ello, los cultivos activos de cada levadura aislada, se inocularon en tubos con 10 mL de YPD líquido (extracto de levadura, 5g/L; peptona, 5g/L; glucosa, 40 g/L) y se incubaron durante 48 horas. Una vez terminado el período de incubación se agitaron los tubos y se centrifugaron durante 5 minutos a 2500-3000 rpm. Los pellets de células se lavaron con 500 μ L de agua pura estéril, se homogeneizaron y el contenido de cada tubo, se trasvasó a un microtubo. Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 13000 rpm y los sobrenadantes obtenidos fueron eliminados y los pellets resuspendidos en el líquido residual. Luego, se agregó a cada microtubo 200 μ L de la solución 1F (Tritón X-100 2%, SDS 1%, ClNa 11mM, Tris HCl pH 8 10 mM, EDTA Na pH 8 10 mM), 200 μ L de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y 0,3 g de perlas de vidrio, y se agitaron durante 3-4 minutos. Posteriormente, se agregó 200 μ L de buffer TE (tris EDTA: Tris HCL pH 8, 10 mM, EDTA Na pH 8, 10 mM) y se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm. Para recuperar la fase acuosa de la parte superior, se utilizó una micropipeta de 200 μ L y se colocó en un tubo nuevo, al cual se agregó 1 mL de etanol 100 % a -18-20 °C para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Se mezcló por inmersión y se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm. Luego los residuos se resuspendieron en 0,1 mL de buffer TE y se agregó 2 μ L de RNasa A (10U/ μ L) para lograr la digestión del ARN. Se incubaron a 37 °C durante 2 horas en baño de agua termostatizado. Concluido este tiempo de incubación, se agregaron 4 μ L de acetato de amonio 10 M y 1 mL de

etanol 100% frío (-20 °C) para favorecer la precipitación del ADN. Se centrifugaron los microtubos durante 2 minutos a 13000 rpm, y los sobrenadantes obtenidos fueron eliminados. Luego se lavaron con 200 μ L de etanol 70%, se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos y se dejaron los tubos abiertos bajo campana extractora de gases para que se secaran. Finalmente se resuspendieron con 50 μ L de buffer TE y se conservaron las muestras a -20°C. El ADN extraído fue cuantificado en geles de agarosa al 0,8% con buffer TBE 1X utilizando una corriente de 100 V durante 1 hora. Las muestras a sembrar se prepararon de la siguiente forma: 2 μ L de ADN + 2 μ L Loading Buffer (LB) + 6-7 μ L de agua miliQ, y para el patrón de peso molecular, 1 μ L del marcador 100 bp + 2 μ L de LB + 7 μ L de agua miliQ. Luego de la electroforesis los geles fueron visualizados con luz UV en fotodocumentador (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK.) Una vez realizada la cuantificación del ADN se procedió a la amplificación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los *primers* NL1 (5'GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') y NL4 (5'GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'). Inicialmente se realizó la desnaturalización del ADN a una temperatura de 95 °C durante 5 minutos. Luego se realizaron 40 ciclos, a 94 °C por 1 minuto; 55,5 °C por 2 minutos; 72 °C por 2 minutos y 1 ciclo de elongación final a 72 °C por 10 minutos. Para la preparación de la mezcla de reacción con un volumen final de 100 μ L se colocaron 15 μ L de ADN diluido (50-100 ng), 10 μ L de buffer de reacción 10X sin MgCl₂, 2 μ L de cada *primer* (50 μ M), 8 μ L de mezcla de dNTP (1 mM), 5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 57,5 μ L de agua miliQ y 0,5 μ L de Taq polimerasa. Para la visualización de las amplificaciones se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1,4%. Se prepararon las muestras a sembrar de la siguiente forma: 2 μ L de producto de amplificación + 2 μ L LB + 6 μ L de agua miliQ y, por otro lado, 1 μ L de marcador de 100 bp + 2 μ L de LB + 7 μ L de agua miliQ. Para la estimación del tamaño de los amplicones se utilizó un marcador de peso molecular 100 bp ADN *ladder*. La electroforesis se realizó en buffer TBE 1X con una corriente de 90 V durante 1 hora. Los geles fueron visualizados con luz UV en fotodocumentador (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK.). Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante *kit PureLink PCR purification* (Invitrogen). Finalmente las muestras fueron enviadas al servicio de secuenciación del INTA Castelar para la obtención de las secuencias de nucleótidos con

cada primer de manera independiente. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias mediante Contig-Expres (Vector Suite Inc.). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas por BLAST (Basic Lineal Alignment Search Tool) con las bases de datos disponibles en la página del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto nacional de Salud (NIH) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

II.3.2. Obtención de parámetros de crecimiento de las cepas de *Z. rouxii* en medio de cultivo y jugo de uva concentrado; y selección de una cepa de *Z. rouxii* mejor adaptada para desarrollar en jugo de uva concentrado para futuro ensayo de estabilidad microbiana.

Esta etapa se realizó con el objeto de seleccionar una cepa de *Z. rouxii* con elevado potencial para alterar los jugos de uva concentrados, que será utilizada en las etapas posteriores del trabajo. Para ello, se evaluó la capacidad de desarrollo en un medio de cultivo con elevadas concentraciones de glucosa y fructosa (38 °Brix) de las cepas aisladas de jugos de uva concentrados, validando luego este resultado en el sustrato natural (jugo de uva concentrado). Para ello, las cepas fueron inoculadas en un medio de cultivo líquido con elevada concentración de azúcares MYGF (extracto de malta, 20 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; glucosa, 193 g/L; fructosa 193 g/L). El ensayo se realizó con agitación constante a una temperatura de 28°C. Las poblaciones de levaduras fueron analizadas simultáneamente por recuento de células viables mediante siembra en superficie en el medio TGY (triptona, 5 g/L; glucosa, 100 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; agar, 20 g/L) (Combina y col., 2008) previa dilución en agua glucosada al 30% y por medición de densidad óptica por espectrofotometría a 600 nm. A partir de ambos valores se construyeron las curvas de crecimiento correspondientes y se determinó la velocidad específica máxima de crecimiento y la fase lag para cada cepa nativa aplicando el modelo de Baranyi (Baranyi y Le Marc, 2008). De las siete levaduras previamente evaluadas se seleccionaron tres de las cepas correspondientes a la especie *Z. rouxii* para ser evaluadas en su capacidad para desarrollar en jugo de uva concentrado. La producción de biomasa y adaptación del inóculo se realizó en el medio MYGF. El ensayo se realizó por triplicado en jugos concentrados a 68 Brix y pH 3,7

inoculados con una población de 10^6 células/mL y mantenidos con agitación a una temperatura de 28°C. Las poblaciones de levaduras fueron analizadas por recuento de células viables mediante siembra en superficie en el medio TGY, previa dilución en agua glucosada al 30% (Combina y col., 2008). Con los valores obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento y se determinó la velocidad máxima de crecimiento y la fase lag para cada cepa utilizando el software DMfit basado en el modelo de Baranyi (Baranyi y Le Marc, 2008). El ajuste de las curvas y el cálculo de los parámetros de crecimiento se realizó para cada replica por separado, lo que permitió luego el análisis estadístico utilizando ANOVA y Test de Fisher para comparaciones múltiples.

II.4. Resultados y Discusión

II.4.1. Identificación y caracterización de levaduras aisladas de jugos de uva concentrados

Las 7 levaduras aisladas de los jugos de uva concentrados fueron identificadas mediante PCR seguido de secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S. Dos de las levaduras fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* y las cinco levaduras restantes fueron asignadas a la especie *Z. rouxii* con un elevado porcentaje de certeza. Las secuencias obtenidas de las 5 levaduras identificadas como *Z. rouxii* fueron depositadas en *GeneBank* (tabla II.1).

Nuestros resultados confirman lo descripto previamente por Combina y col. (2008) quienes en muestreos realizados anteriormente en distintas plantas concentradoras, encontraron que *Z. rouxii* fue la responsable de la alteración del 100 % de los jugos de uva concentrados alterados. También se encontraron otras especies de levaduras en jugos de uva concentrados no alterados como *S. cerevisiae*, *K. delphensis*, *S. pombe*, consideradas levaduras osmotolerantes que si bien toleran las condiciones de baja a_w y bajo pH, no son capaces de producir alteración como *Z. rouxii* la cual es una levadura osmófila capaz de alterar este tipo de sustratos. Existen escasos estudios sobre la incidencia de levaduras osmofílicas en alimentos azucarados. En un extenso trabajo realizado por Senses-Ergul y col. (2006) en Turquía, se analizaron 129 alimentos con alto contenido de azúcar entre los que se incluyeron yogurt de frutas, miel, frutos secos,

melaza, mermeladas, pasteles de frutas, azúcar refinado, jugos y concentrados de frutas. Estos autores aislaron 73 cepas de levaduras que fueron identificadas a nivel de género y especie mediante el uso de un sistema comercial (APILAB Plus- bioMérieux, Francia). En este estudio sólo dos cepas de *Z. rouxii* se pudieron aislar de frutas secas siendo dominantes otras especies como *Candida spp* en frutas secas, miel, muestras de yogurt de frutas, entre otros.

Tabla II.1. Identificación de levaduras aisladas de jugos de uva concentrados mediante secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S.

Código	Ap ^a (pb)	Identificación final	%Homología ^b	%Cobertura	GeneBank (Nº acceso)
MR4	600	<i>Z. rouxii</i>	100	100	KJ909204
M13	600	<i>S. cerevisiae</i>	92	93	-
MC8	600	<i>Z. rouxii</i>	98	100	KJ909202
MT6	600	<i>Z. rouxii</i>	99	100	KJ909205
MJ3	600	<i>S. cerevisiae</i>	99	100	-
MC9	600	<i>Z. rouxii</i>	100	100	KF0027111
MC10	600	<i>Z. rouxii</i>	99	100	KJ909203

a: longitud del amplificado 26S, b: porcentaje de homología de la secuencia en estudio respecto de la secuencia de la base de datos.

II.4.2. Obtención de parámetros de crecimiento de las cepas de *Z. rouxii* en medio de cultivo y jugo de uva concentrado; y selección de una cepa de *Z. rouxii* mejor adaptada para desarrollar en jugos de uva concentrados para futuro ensayo de estabilidad microbiana.

Las siete levaduras evaluadas presentaron diferentes curvas de crecimiento, y los parámetros de crecimiento calculados a partir de los datos obtenidos mediante las dos técnicas de medición, recuento de ufc/mL y densidad óptica (DO) fueron diferentes (tabla II.2).

Tabla II.2. Parámetros de crecimiento y coeficientes de regresión de ajuste al modelo para valores experimentales obtenidos por densidad óptica y por recuento de células viables en medio de cultivo MYGF.

Levadura	Métodos de estimación de crecimiento					
	Densidad óptica a 600 nm (promedio ± DS)			Recuento de células viables (promedio ± DS)		
	μ_{\max}	λ (horas)	R^2	μ_{\max}	Λ (horas)	R^2
MR4	0,11±0,00 ^a	7,96±0,51 ^b	0,997	0,07±0,01 ^a	2,26±1,60 ^{ab}	0,992
M13	0,12±0,01 ^a	6,83±1,43 ^b	0,996	0,13±0,01 ^a	0,19±0,33 ^a	0,994
MC8	0,15±0,00 ^a	7,01±0,17 ^b	0,999	0,16±0,09 ^a	2,65±2,68 ^{ab}	1
MT6	0,37±0,01 ^d	5,43±0,01 ^a	0,999	0,09±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1
MJ3	0,29±0,08 ^c	5,40±0,03 ^a	0,997	0,16±0,01 ^a	3,11±0,90 ^{ab}	0,997
MC9	0,15±0,00 ^{ab}	4,77±0,09 ^a	1	0,13±0,02 ^a	4,45±0,15 ^b	0,959
MC10	0,22±0,00 ^b	5,01±0,51 ^a	0,983	0,11±0,08 ^a	2,85±1,58 ^{ab}	0,909

Letras distintas dentro de la misma columna significan diferencias significativas (Test de Fisher $p \leq 0,05$). μ_{\max} : velocidad máxima de crecimiento, λ : fase de latencia, DS: desviación estándar.

En general, las velocidades máximas de crecimiento y las fases lag fueron similares o menores para las curvas realizadas con los datos de recuentos de levaduras viables. Esto puede deberse a que pequeños cambios en las poblaciones iniciales no pudieron ser detectados por densidad óptica, mostrando fases lag considerablemente mayores, pero una vez que se alcanzó una población crítica, los cambios en la turbidez se hicieron detectables. Las diferencias en los valores obtenidos en el parámetro velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) se deben a que ésta se expresa en unidades diferentes (DO/t o Log ufc/t) según el parámetro utilizado para la medición. De todos modos, ambas metodologías de estimación del crecimiento permitieron evidenciar las levaduras más rápidas y las más lentas para desarrollar en este medio de cultivo, a pesar de que no en todos los casos esta observación presentó diferencia significativa en el análisis estadístico (tabla II.2). Debido a la limitación de la medición de densidad óptica para detectar cambios en la población por debajo de un número de células ($\leq 10^6$ células/mL), se continuó trabajando con el recuento de células viables para construcción de curvas y

cinéticas de crecimiento, reservando la medición de densidad óptica para la estimación de población en medios con elevada concentración de células, como la preparación de inóculos.

De las siete levaduras estudiadas se seleccionaron tres correspondientes a la especie *Z. rouxii* para ser evaluadas en su capacidad para desarrollar en jugo de uva concentrado. Se seleccionaron las cepas MR4, MT6 y MC9 que presentaron diferencias en la fase de latencia, evaluadas mediante el recuento de células viables, para ser probadas en la próxima etapa en jugos de uva concentrados a 68 °B a pH 3,7 (tabla II.2).

Cuando estas tres cepas de *Z. rouxii* fueron evaluadas en el sustrato natural se evidenciaron diferentes curvas de crecimiento donde se observa que la cepa MC9 muestra una mayor velocidad de crecimiento y una menor fase lag (figura II.1). Por otro lado, la alteración del jugo de uva concentrado, la cual se evidencia por un aumento de turbidez y producción de gas, se hizo visible a los 7 días para la cepa MC9, 11 días para la cepa MT6 y 15 días para la cepa MR4 cuando los recuentos alcanzaron poblaciones de 4×10^6 ufc/mL aproximadamente (figura II.1.2). Como se había observado anteriormente, la medición de densidad óptica en jugo de uva concentrado, no resultó una metodología adecuada para la construcción de las curvas de crecimiento, ya que no permitió evaluar los cambios reales de la población microbiana (figura II.1.1).

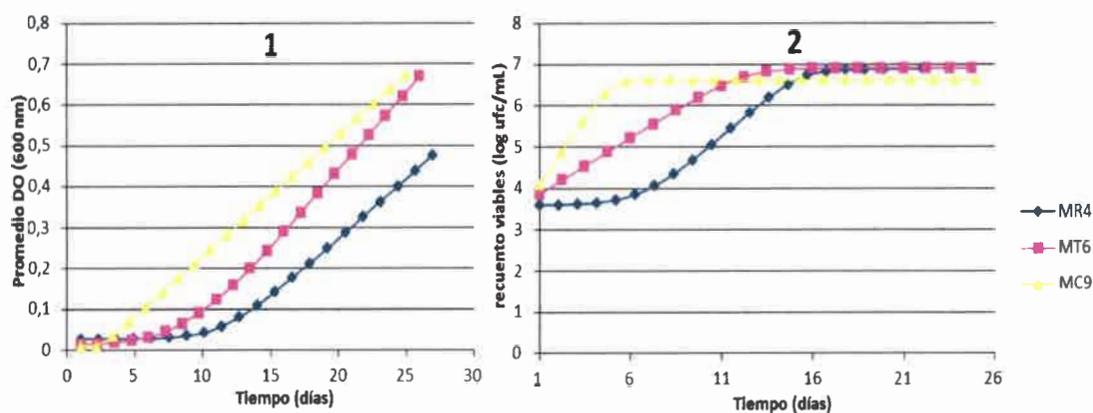


Figura II.1. Poblaciones de diferentes cepas de *Z.rouxii* en jugo de uva concentrado a 68 °B y pH 3,7 seguidas por densidad optica (1) y recuento de células viables (2).

En la tabla II.3 se muestran los parámetros de crecimiento calculados, con los análisis estadísticos correspondientes, para las 3 cepas en estudio. A pesar que las diferencias no fueron significativas entre los parámetros de crecimiento calculados para la mayoría de las cepas, se observó una tendencia que permitió seleccionar la cepa MC9 para los estudios posteriores.

Tabla II.3. Parámetros de crecimiento y coeficientes de regresión de ajuste para valores experimentales obtenidos por recuento de células viables de 3 cepas de *Z. rouxii* en jugo de uva concentrado a 68 °Brix pH 3,7.

Cepa	Parámetros (promedio ± DS)		
	μ_{\max}	λ (días)	R ²
MR4	0,38 ± 0,09 ^a	6,19 ± 0,36 ^b	0,86
MT6	0,31 ± 0,01 ^a	1,41 ± 0,16 ^a	0,76
MC9	0,72 ± 0,32 ^a	0,55 ± 0,77 ^a	0,71

Letras distintas dentro de la misma columna significan diferencias significativas (Test de Fisher $p \leq 0,05$). μ_{\max} : velocidad máxima de crecimiento, λ : fase de latencia, DS: desviación estándar.

Estudios previos han demostrado que la alteración de diversos productos con alto contenido de azúcar, como la miel, jarabes, frutas secas, jugos de frutas concentrados, caña de azúcar, mermeladas y jaleas, es causada principalmente por el metabolismo de las levaduras osmófilas y esa alteración se pone en evidencia por la fermentación de los azúcares presentes en dichos alimentos (Deak y Beuchat, 1993; Tokuoka, 1993). Por otro lado, Leandro y col., (2003) demostraron que debido a la alta resistencia a los conservantes y osmotolerancia extrema, *Z. rouxii* es una de las principales levaduras implicadas en el deterioro de los alimentos dulces y bebidas. En contraste, con *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* es una levadura fructofílica que consume la fructosa más rápido que la glucosa. Estos resultados son comparables a los encontrados en nuestro estudio ya que podemos confirmar que existen levaduras osmofílicas capaces de crecer en

condiciones de alta concentración de azúcar, como el jugo de uva concentrado y son capaces de producir la alteración del mismo, lo que puede provocar tanto el rechazo de los consumidores como el de los compradores, lo que implica grandes pérdidas económicas.

II.5. Conclusiones de este capítulo

- ✓ La levaduras aisladas de jugos de uva concentrados corresponden al grupo de levaduras osmotolerantes y osmófilas, pertenecientes a las especies *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*, respectivamente.
- ✓ El medio de cultivo con elevada concentración de azúcares permitió evidenciar las diferencias en los parámetros de crecimiento (velocidad máxima de crecimiento y fase de latencia) de las distintas levaduras y pre-seleccionar 3 cepas de *Z. rouxii* MR4, MT6 y MC9 con diferente comportamiento.
- ✓ La cepa *Z. rouxii* MC9 mostró la mayor velocidad de crecimiento y menor fase lag en jugo de uva concentrado lo que permitió seleccionarla para los ensayos de estimación de vida útil, ya que presentaría el mayor potencial alterador.

Capítulo III

Capítulo III: “Efecto del pH y la concentración de azúcar sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* en jugos de uva concentrados mantenidos a temperatura de almacenamiento y transporte”

III.1. Hipótesis

- ✓ El pH y la concentración de azúcares condicionan el crecimiento de *Z. rouxii* y el tiempo para evidenciar alteración en jugos de uva concentrados.
- ✓ La estabilidad microbiológica del jugo de uva concentrado puede prolongarse ajustando los parámetros propios del sustrato (pH y °Brix).
- ✓ Las temperaturas de almacenamiento y transporte influyen en la estabilidad microbiana del jugo de uva concentrado.

III.2. Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar el efecto combinado de dos variables (pH y concentración de azúcar) sobre los parámetros de crecimiento de una cepa nativa de *Z. rouxii* en jugo de uva concentrado utilizando la metodología de superficie de respuesta.
- ✓ Estimar el tiempo para producir alteración de la cepa *Z. rouxii* MC9 a diferentes pH y concentración de azúcar en condiciones de temperatura de almacenamiento y transporte utilizando la metodología de superficie de respuesta.

III.3. Materiales y Métodos

III.3.1. Evaluación del efecto combinado del pH y concentración de azúcar sobre el crecimiento de *Z. rouxii* MC9 y el tiempo para producir alteración en jugos de uva concentrados aplicando la metodología de superficie de respuesta (SR) en condiciones de almacenamiento y transporte.

Se trabajó con la cepa *Z. rouxii* MC9, la cual presentó una mejor adaptación y un mayor potencial de crecimiento en jugos de uva concentrados. Antes de la inoculación en el sustrato natural (jugo de uva concentrado) se realizó una adaptación de la cepa en un medio con elevada concentración de azúcares (MYGF) para evitar la muerte de las levaduras por *shock* osmótico. Este medio se incubó durante 3 días sin agitación a 28°C, hasta obtener una población de 10^7 cél/mL, al final de la fase exponencial. El ensayo se realizó con jugos de uva concentrados provistos por una empresa local ubicada al Este de la provincia de Mendoza. La experiencia consistió en 99 unidades experimentales de 1000 mL colocadas en bolsas estériles con válvula Vitop®. Las bolsas se colocaron dentro de recipientes de acero inoxidable que simulaban las condiciones de almacenamiento y transporte de los jugos de uva concentrados. El diseño experimental se obtuvo a partir de la combinación de dos variables (pH y concentración de azúcares) con 5 niveles para el pH y 3 niveles para concentración de azúcar. Las variables y niveles cubrieron el rango de los productos generalmente comercializados, y fueron: pH: 1,7; 1,9; 2,1; 2,5 y 3,2 y concentración de azúcar expresada en grados Brix: 64 (779 g/ L de azúcar reductor; a_w : $0,78 \pm 0,03$), 66 (810 g/ L; a_w : $0,77 \pm 0,03$) y 68 ° Brix (842 g/ L; a_w : $0,75 \pm 0,03$) (tabla III.1). El ensayo fue realizado por triplicado en series de ensayos independientes.

Tabla III.1. Diferentes tratamientos (combinaciones de pH y °Brix) contemplados en el diseño experimental en condiciones de temperatura constante y variable.

Tratamiento	°Brix	pH
1		
2		1,7
3		
4		
5	64	2,5
6		
7		
8		3,2
9		
10		
11		1,7
12		
13		
14	66	2,5
15		
16		
17		3,2
18		
19		
20		1,7
21		
22		
23		1,9
24		
25		
26	68	2,1
27		
28		
29		2,5
30		
31		
32		3,2
33		

Nota: Todos los experimentos fueron controlados por un tiempo máximo de 60 días

Para alcanzar los diferentes valores de pH, los jugos de uva fueron tratados con resinas de intercambio iónico antes de la concentración, este tratamiento reproduce las prácticas utilizadas por las plantas concentradoras para ajustar los valores de pH y acidez. La concentración de azúcar de los jugos concentrados expresada en °Brix se confirmó utilizando un refractómetro digital (Atago PAL-2, Japón) y el pH se controló utilizando un medidor de pH digital (ALTRONIX, Estados Unidos). Cada tratamiento se inoculó con 10^2 cél/mL de la cepa *Z. rouxii* MC9, que representa el límite máximo recomendado para el recuento de hongos y levaduras por los mercados compradores. Para cada serie experimental también se introdujo un control negativo. El ensayo se realizó en condiciones de temperatura constante a 23°C, simulando las condiciones de almacenamiento del producto. Paralelamente, se realizó un ensayo donde los mismos tratamientos fueron incubados a temperatura variable que reproducían las condiciones de transporte cuándo los jugos de uva son exportados a países del Hemisferio Norte. El perfil de temperatura aplicado fue construido con los datos aportados durante la exportación del vino a destinos del Hemisferio Norte (Leinberger de 2006, Hartley, 2008). Las temperaturas internas y externas fueron controladas mediante sensores *iButton*® colocados dentro de la bolsa y el exterior de los recipientes de acero inoxidable en los tratamientos control. El perfil de temperatura variable aplicado se muestra en la figura III.1. Se observan tres regiones diferentes en esta figura. La primera sección de la gráfica simula el periodo de tiempo donde los contenedores permanecen hasta su embarque en el puerto de Santiago (Chile) en verano donde las temperaturas entre el día y la noche oscilan entre 32 y 16°C. La sección central simula el viaje por mar desde Santiago (Chile) a algún destino del continente asiático (por ejemplo, Rusia o Japón). Esta parte de la gráfica sugiere que durante el viaje por mar, la temperatura se mantiene constante (28°C). La última sección de la gráfica simula el tiempo y temperatura cuando los contenedores permanecen en el puerto de destino en invierno, donde la temperatura llega a un mínimo de 2°C. El tiempo de envío simulado fue de 45 días y luego las muestras fueron mantenidas a 23°C hasta completar los 60 días del ensayo.

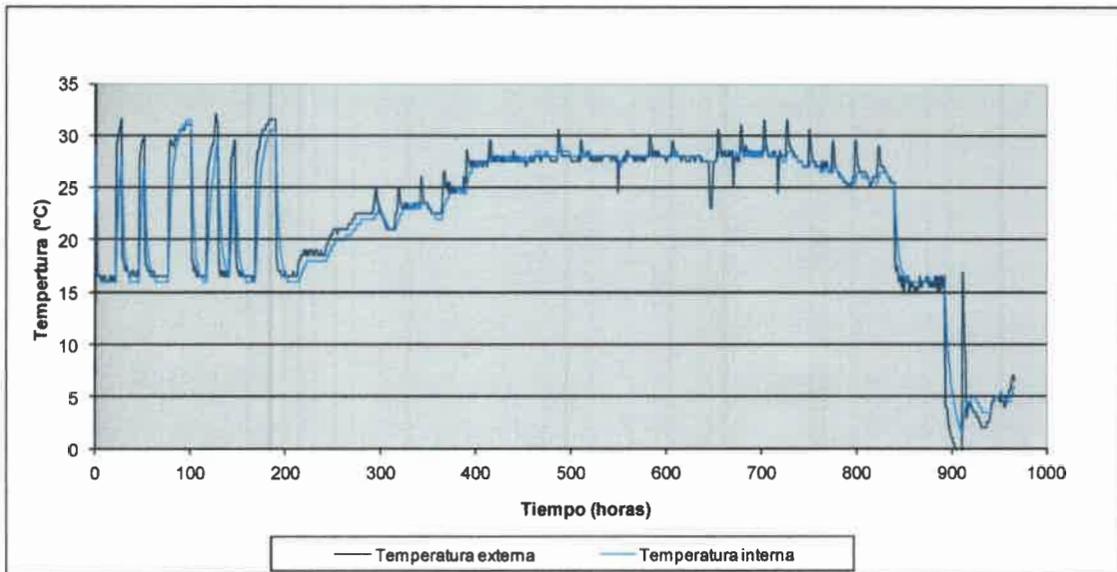


Figura III.1. Perfiles de temperatura (interna y externa) registradas durante el experimento que reproduce la temperatura durante la exportación del jugo de uva concentrado desde el Hemisferio Sur (verano) al Hemisferio Norte (invierno).

El desarrollo microbiano fue periódicamente controlado durante 60 días o hasta observar alteración visible, previa dilución en agua glucosada al 30% y siembra en superficie en medio para levaduras osmófilas y osmotolerantes, MY50G (extracto de malta, 10 g/L; extracto de levadura, 2,5 g/L; glucosa, 500 g/L; agar, 10 g/L) y TGY (triptona, 5 g/L; glucosa, 100 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; agar, 20 g/L), respectivamente (Combina y col, 2008). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 3-5 días. Con los valores de recuentos de células viables, se determinaron los parámetros de crecimiento de la levadura *Z. rouxii* en las distintas condiciones evaluadas a temperatura constante utilizando el software DMfit basado en el modelo de Baranyi (Baranyi y Le Marc, 2008).

Para la evaluación del efecto combinado de ambas variables sobre los parámetros de crecimiento se utilizó la metodología de superficie de respuesta (SR) como modelo secundario. Los parámetros de crecimiento (μ_{\max} y λ) y tiempo para producir alteración (TPA) en ambos sistemas de temperatura (constante: C y variable: V) se ajustaron a una ecuación de SR de la forma general:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \epsilon \quad (1)$$

dónde Y es el parámetro de modelado (μ_{\max} , λ , TPA-C o TPA-V), β_0 es la media/intercepción, β_1 son los coeficientes a estimar durante el ajuste de SR (β_1 es el coeficiente para el efecto lineal de X_1 , β_{11} para el efecto cuadrático de X_1 , β_{12} para la interacción entre las variables X_1 y X_2 , y así sucesivamente), ε es el término de error y X_1 y X_2 son las variables en estudio (pH y la concentración de azúcar expresada en °Brix). Para determinar el efecto principal, los coeficientes de regresión se interpretan como el aumento o la disminución (dependiendo del signo del coeficiente positivo o negativo) en la respuesta cuando se cambia el factor en una unidad. El análisis de superficie de respuesta se realizó empleando el módulo de diseño experimental del paquete de *software* Statistica 7.0, utilizando el error puro derivado de repeticiones de los experimentos en el ANOVA correspondiente. El ajuste del modelo fue verificado por el coeficiente R^2 (porcentaje de la variabilidad en la respuesta que puede ser explicada por el modelo).

III.4. Resultados y Discusión

Se evaluó el efecto combinado del pH y la concentración de azúcar (°Brix) en los parámetros de crecimiento de la cepa *Z. rouxii* MC9 en los jugos de uva concentrados en condiciones de temperatura constante (23°C) que simula las condiciones de almacenamiento utilizando un análisis de superficie de respuesta. En condiciones de temperatura variable (que simula temperaturas de transporte) no fue posible modelar los parámetros de crecimiento de la cepa porque las condiciones de ensayo no eran isotérmicas. Pero sí fue posible aplicar un modelo de superficie de respuesta para el parámetro denominado “tiempo para producir alteración” (TPA), el cual también fue modelado para temperaturas constantes.

En condiciones de temperatura constante, se construyeron las curvas de crecimiento y se calcularon los parámetros velocidad máxima de crecimiento y fase de latencia de *Z. rouxii* MC9 para las diferentes condiciones ensayadas. La tabla III.2 muestra los valores μ_{\max} y λ obtenidos para las diferentes condiciones incluidas en el diseño experimental. De este modo, μ_{\max} osciló entre 0,058 (experimentos con pH 1,7) a 0,530 (pH 2,5 y 64 °Brix), mientras que λ osciló entre < 1 (pH a 3,2) a > 60 días (pH 1,7).

Tabla III.2. Parámetros de crecimiento de *Z. rouxii* MC9 (μ_{\max} , velocidad máxima de crecimiento; λ , duración de la fase de latencia) obtenidas en condiciones de temperatura constante (23°C) para diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	°Brix	pH	μ_{\max} (días ⁻¹)	? (días)
1				
2		1,7	-	>60
3				
4			0,360	2,23
5	64	2,5	0,530	1,39
6			0,199	3,07
7			0,417	
8		3,2	0,404	<1
9			0,434	
10				
11		1,7	-	>60
12				
13			0,287	4,14
14	66	2,5	0,285	1,99
15			0,262	6,29
16			0,455	0,88
17		3,2	0,392	1,59
18			0,422	0,17
19				
20		1,7	-	>60
21				
22			0,058	17,38
23		1,9	0,085	17,28
24			0,066	17,33
25			0,140	11,97
26	68	2,1	0,132	8,42
27			0,115	15,52
28			0,181	6,73
29		2,5	0,165	12,1
30			0,168	9,37
31			0,185	0,95
32		3,2	0,182	2,29
33			0,192	<1

Nota: Todos los experimentos fueron llevados a cabo en jugo de uva concentrado y controlados por un tiempo máximo de 60 días.

Las ecuaciones de SR que predicen la respuesta de ambos parámetros de crecimiento en función de las variables ambientales pueden deducirse fácilmente de la tabla III.3, mediante la sustitución de los términos significativos en la ecuación general 1. De este modo las ecuaciones para cada parámetro de crecimiento en función de las variables evaluadas son las siguientes:

$$\mu_{\max} (\log_{10} \text{ ufc/mL días}^{-1}) = -50.035 + 1.409 \text{ °Brix} - 0.010 \text{ °Brix}^2 + 3.765 \text{ pH} - 0.162 \text{ pH}^2 - 0.041 \text{ °Brix} \cdot \text{pH} \quad (2)$$

$$\lambda (\text{días}) = -2221.430 + 85.390 \text{ °Brix} - 0.700 \text{ °Brix}^2 - 419.81 \text{ pH} + 45.270 \text{ pH}^2 + 2.45 \text{ °Brix} \cdot \text{pH} \quad (3)$$

Estas ecuaciones polinómicas, en términos físicos, pueden ser utilizadas en la industria para estimar el comportamiento de *Z. rouxii* en función de diversas combinaciones de pH y concentración de azúcar dentro del rango experimental estudiado (región de interpolación).

Tabla III.3. Coeficientes de regresión estimados por análisis ANOVA para parámetros de crecimiento (μ_{\max} and λ) de *Z. rouxii* MC9 en condiciones de temperatura constante (23°C).

Coeficiente Regresión	Valor	Desviación Standard
Modelo para μ_{\max}		
β_0 (Media/Intercepción)	-50,035	23,086
β_1 °Brix (L)	1,409	0,696
β_2 °Brix (Q)	-0,010	0,005
β_3 pH (L)	3,765	0,654
β_4 pH (Q)	-0,162	0,037
β_5 °Brix * pH	-0,041	0,009
R^2	0,902	
Falta de ajuste	0,181	
Error Puro	0,061	
Modelo para λ		
β_0 (Medio/Intercepción)	-2221,430	683,381
β_1 °Brix (L)	85,390	20,607
β_2 °Brix (Q)	-0,700	0,155
β_3 pH (L)	-419,81	19,365
β_4 pH (Q)	45,270	1,101
β_5 °Brix * pH	2,45	0,285
R^2	0,928	
Falta de ajuste	0,000	
Error Puro	53,940	

Nota: Los coeficientes significativos fueron determinados por el diagrama de Pareto.

La figura III.2 (a) muestra la representación gráfica de estas ecuaciones para μ_{\max} y λ , respectivamente. Ambos gráficos muestran un claro efecto del pH sobre los parámetros de crecimiento estudiados. Cuando el pH disminuye, el valor μ_{\max} disminuye (correlación positiva), mientras que λ aumenta (correlación negativa), lo cual es indicativo de un claro efecto inhibitorio de este factor en el retraso del crecimiento de la levadura.

La figura III.2 (b) muestra los diagrama de Pareto para el efecto estandarizado de las variables en estudio sobre μ_{\max} y λ , respectivamente. Excepto el efecto cuadrático de °Brix para μ_{\max} , todos los coeficientes de regresión fueron retenidos en un valor de $p < 0,05$. Como puede deducirse, se observó que el mayor efecto sobre ambos parámetros de crecimiento fue producido por el pH (efecto lineal y cuadrático en este orden), seguido por la interacción °Brix*pH y el efecto lineal de °Brix (en el caso de μ_{\max}) y el efecto lineal de °Brix, la interacción °Brix*pH y el efecto cuadrático de °Brix (en el caso de λ). Probablemente, el menor efecto de la concentración de azúcares sobre los parámetros de crecimiento, en comparación con el pH, fue debido a la buena adaptación de esta levadura a altas presiones osmóticas.

En el tratamiento de pH 1,7 no se observó desarrollo de esta cepa en ninguna de las concentraciones de azúcar evaluadas; observándose una drástica pérdida de viabilidad de la cepa después de 24 – 48 horas. Aunque la levadura fue incapaz de crecer a pH 1,7 dicha condición extrema es difícil de conseguir a nivel industrial y es muy poco solicitada por los mercados compradores.

Paralelamente, los mismos tratamientos fueron incubados a temperatura variable que reproducían las condiciones de transporte cuando los jugos de uva son exportados a países del Hemisferio Norte. El tiempo para observar alteración (TPA) por *Z. rouxii* MC9 en jugos de uva concentrados se modeló en ambas condiciones de temperatura, constante y variable.

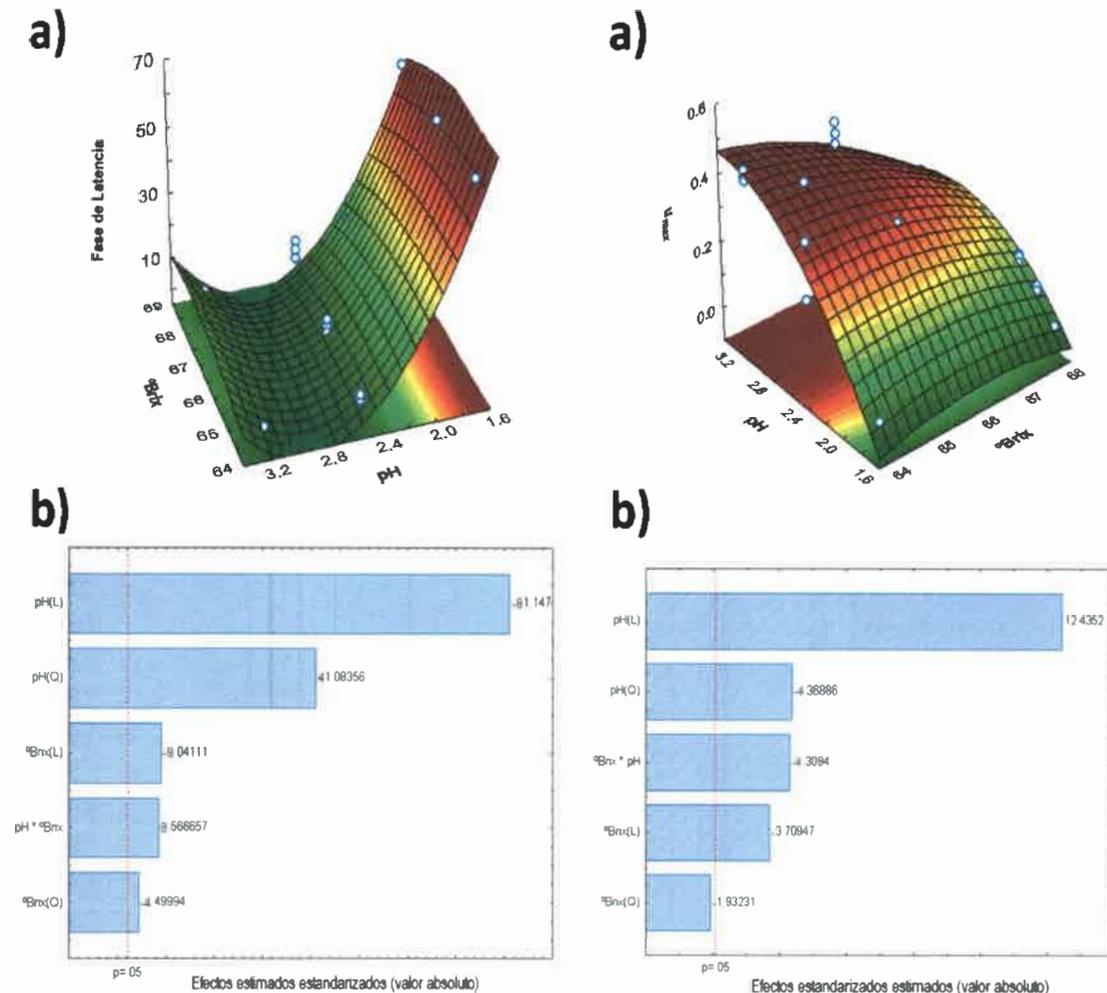


Figura III.2. Gráficos de superficie de respuesta (a), diagramas de Pareto estandarizado (b) y coeficientes de regresión para la fase de latencia y μ_{max} de *Z. rouxii* MC9 en función del pH y °Brix a 23°C en jugos de uva concentrados.

La tabla III.4 muestra los valores de TPA obtenidos para las diferentes condiciones ensayadas en el diseño experimental. Como se puede deducir fácilmente a partir de esta tabla, TPA cambia en función del pH y la concentración de azúcar evaluada. De este modo, TPA-C (23 °C) osciló entre 13,66 (pH 3,2 y 64 °Brix) a mayor a 60 días (pH 1,7), mientras que TPA-V (temperatura variable) osciló entre 12,66 (pH 3,2 y 64 °Brix) y mayor a 60 días con el valor de pH más bajo (1,7). En general, los tratamientos realizados a temperatura variable mostraron una estabilidad microbiana ligeramente inferior a las realizadas a temperatura constante (tabla III.4). En el valor de pH más

favorable para el crecimiento de esta levadura (3,2), el aumento de la concentración de azúcares de 64 a 68 °Brix, duplicó el tiempo de estabilidad microbiana del producto para ambas condiciones de temperatura.

Tabla III.4 Tiempo para producir alteración (TPA) por *Z. rouxii* MC9 en jugo de uva concentrado a temperatura constante y variable para diferentes (combinaciones de pH y °Brix) contemplados en el diseño experimental.

°Brix	pH	TPA-C ± DS (días)	TPA-V ± DS (días)
64	1,7	>60	>60
	2,5	14,00±0,5	17,00±0,5
	3,2	13,66±0,5	12,66±0,5
66	1,7	>60	>60
	2,5	26,00±0,5	21,00±0,5
	3,2	14,00±0,5	14,00±0,5
68	1,7	>60	>60
	1,9	>60	>60
	2,1	48,00±0,5	41,00±0,5
	2,5	35,00±0,5	24,00±0,5
	3,2	26,00±0,5	23,00±0,5

Nota: El seguimiento del experimento se llevó a cabo durante 60 días.

La tabla III.5 muestra los resultados obtenidos a partir del análisis ANOVA de regresión para los parámetros TPA-C y TPA-V de *Z. rouxii* MC9 en función de las variables ensayadas. La variación en la respuesta que se explica por los modelos fue la más alta, con 96,7 y 97,6% para TPA-C y TPA-V, respectivamente.

Tabla III.5. Coeficientes de regresión estimados por análisis de ANOVA para tiempo para producir alteración (TPA) por *Z. rouxii* MC9 en jugo de uva concentrado a temperatura constante (C, 23°C) y variable (V).

Coeficiente de regression	Valor	Desviación Standard
Modelo para TPA-C		
β_0 (Media/Intercepción)	2849,592	201,003
β_1 °Brix (L)	-79,148	6,061
β_2 °Brix (Q)	0,596	0,045
β_3 pH (L)	-232,069	5,696
β_4 pH (Q)	20,771	0,324
β_5 °Brix * pH	1,537	0,084
R ²	0,967	
Falta de ajuste	0,000	
Error Puro	4,670	
Modelo para TPA-V		
β_0 (Media/Intercepción)	2771,561	210,003
β_1 °Brix (L)	-75,864	6,061
β_2 °Brix (Q)	0,573	0,045
β_3 pH (L)	-228,12	5,696
β_4 pH (Q)	27,544	0,324
β_5 °Brix * pH	0,956	0,084
R ²	0,976	
Falta de ajuste	0,000	
Error Puro	4,670	

Nota: Los coeficientes significativos fueron determinados por el diagrama de Pareto

Todos los términos de regresión fueron retenidos en las ecuaciones matemáticas, con valores muy similares para ambas condiciones de temperatura. De esta manera, a partir de la tabla III.5 se deducen las ecuaciones de SR que predicen el TPA del jugo de uva concentrado en función del pH y de la concentración de azúcares en ambas condiciones de temperaturas, constante y variable. Mediante la sustitución de los términos

significativos en la ecuación general. Las respectivas ecuaciones SR para TPA son las siguientes:

$$\text{TPA-C (días)} = -2849,592 - 79,148 (\text{°Brix}) + 0,596 (\text{°Brix})^2 - 232,069 (\text{pH}) + 20,771 (\text{pH})^2 + 1,537 (\text{°Brix}) * (\text{pH}) \quad (4)$$

$$\text{TPA-V (días)} = -2.771,561 - 75,864 (\text{°Brix}) + 0,573 (\text{° Brix})^2 - 228,12 \text{ pH} + 27,544 (\text{pH})^2 + 0,956 (\text{°Brix}) * (\text{pH}) \quad (5)$$

Ambas ecuaciones permiten una estimación del tiempo (días) que *Z. rouxii* necesita para llegar a una población de 10^6 ufc/mL, población en la cual se produce la alteración del producto, ya sea en condiciones de temperatura constante o variable.

La representación gráfica del efecto combinado de los factores limitantes del crecimiento que extienden la estabilidad microbiana del producto en condiciones de temperatura constante y variable se muestran en las figura III.3. Ambos gráficos de superficie de respuesta presentan una morfología muy similar. Los mayores efectos se observan en los efectos lineales y cuadráticos del pH. De este modo, una disminución gradual de pH se correlaciona directamente con el aumento de la estabilidad microbiana del producto, que muestra una mayor diferencia en las concentraciones más altas de azúcar evaluadas. A valores de pH por debajo de 2,5, pequeñas variaciones en unidades de pH representan un aumento significativo en la vida útil del producto. En los jugos de uva concentrados con un pH por debajo de 2,0 aumentó la vida útil del producto durante más de 60 días.

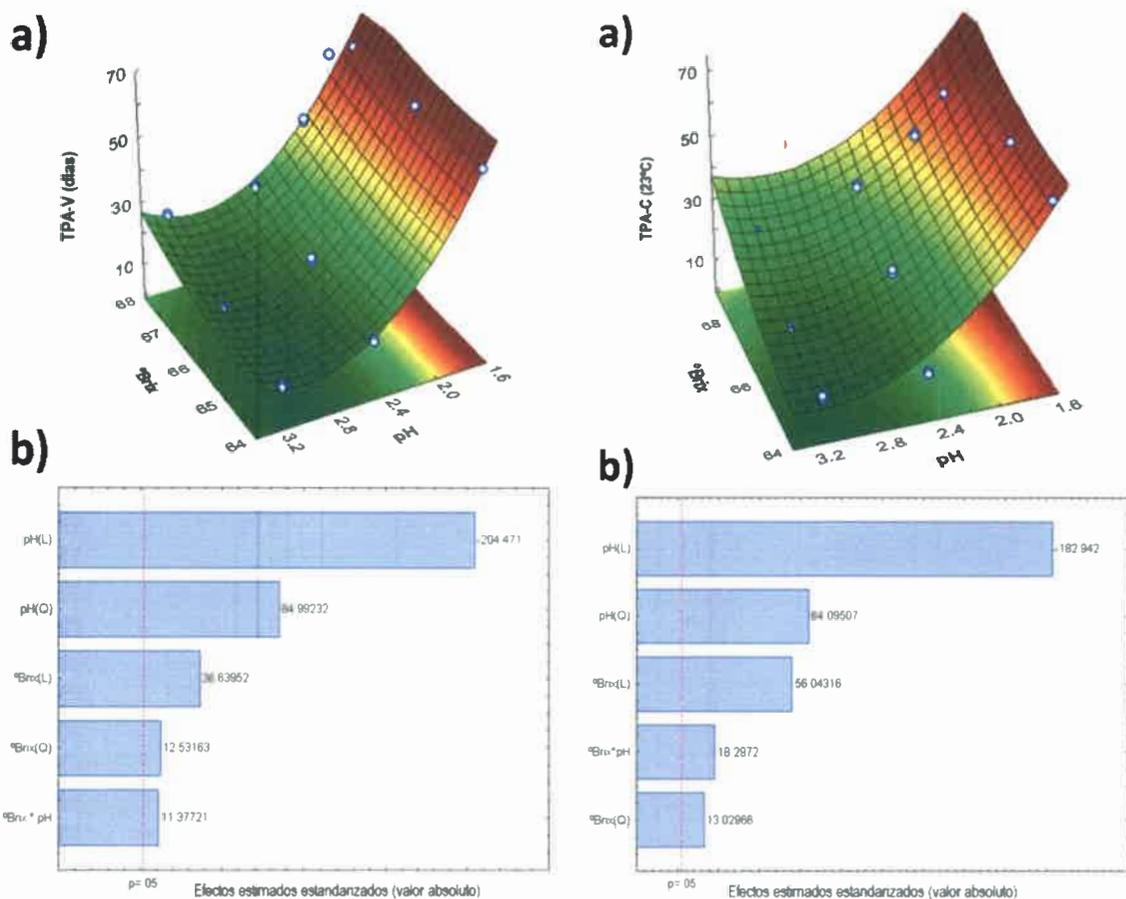


Figura III.3. Gráficos de superficie de respuesta (a), diagramas de Pareto estandarizado (b) y coeficientes de regresión para el tiempo necesario para producir alteración de *Z.rouxii* MC9 en función del pH y °Brix en jugos de uva concentrados en condiciones de temperatura variable y constante, respectivamente.

Ciertas especies de levaduras se han aislado, especialmente a partir de alimentos con bajo pH y alta concentración de azúcar. Además, existen levaduras responsables del deterioro de productos que contienen sorbato y benzoato como conservantes, como así también en alimentos con presencia de alcohol donde la mayoría de las especies bacterianas son inhibidas (Praphailong y Fleet, 1997; Evans y col., 2004). Por otro lado, muchos factores ambientales afectan el crecimiento de las levaduras, pero la respuesta a cada condición ambiental particular difiere entre las especies (Praphailong y Fleet, 1997).

Muchas especies de levadura son capaces de tolerar un amplio rango de pH, desde pH 1,5 a 10,0. De hecho, la mayoría de las levaduras prefieren un medio ligeramente ácido entre 3,5 y 6,0, que es el pH encontrado en la mayoría de los jugos de frutas, bebidas y refrescos. La actividad de agua de los alimentos es también un factor muy importante que limita el crecimiento de las levaduras. Aunque la mayoría crecen fácilmente con un 20 % (p/v) de glucosa, sólo un número limitado de especies de levaduras son capaces de crecer a baja a_w , es decir, con altos niveles de concentración de azúcar (60% p/v) (Tilbury, 1980a,b). Por otra parte, *Z. rouxii* es capaz de crecer en un amplio rango de valores de pH, tales como 1,8 a 8,0 en presencia de alta concentración de azúcar (Tokuoka, 1993) o pH 1,5 a 10,5 en un medio con 12 % de glucosa (Restaino y col., 1983). En una revisión completa de las levaduras alterantes de los alimentos, Fleet (1992) sugirió que altos niveles de concentración de azúcar pueden aumentar o disminuir la tolerancia de las levaduras a bajos pHs y destacó que debe considerarse cada especie de levadura y cada alimento en particular para poder llegar a conclusiones válidas en cada caso.

Membré y col. (1999) estudiaron el efecto combinado del pH y alta concentración de azúcar en la tasa de crecimiento de *Z.rouxii* en medios de cultivo de laboratorio. Sus resultados demostraron que el aumento de la concentración de azúcar de 300 g/L (a_w : 0,957) a 800 g/L (a_w : 0,843) produjo una reducción de la velocidad de crecimiento específico de esta levadura. Además, observaron que la tasa de crecimiento en los niveles más altos de concentración de azúcar evaluados, tales como 875 (a_w : 0,810) y 950 (a_w : 0,788) g/L, fue muy baja. Por otro lado, un pH de 2,5 produjo una reducción del 30% en la tasa de crecimiento, y no se observó crecimiento a un pH de 2,0 en ninguna concentración de azúcar evaluada. Nuestros resultados coinciden parcialmente con las observaciones de estos autores, ya que en el presente trabajo, un pH de 1,9 permitió un lento crecimiento de la levadura *Z. rouxii* en jugo de uva concentrado a 23 °C, mientras que a pH 1,7 no se observó crecimiento aún después de los 60 días de ensayo. Estudios previos, informaron que el valor mínimo de pH que permite el crecimiento de *Z. rouxii* depende de la cepa, del medio de cultivo empleado y el compuesto utilizado para acidificar el medio de cultivo (Splittstoesser, 1987; Tokuoka, 1993). Martorell y col. (2007) encontraron que un pH de 2,2 fue el mínimo valor que permitió el crecimiento de dos cepas de *Z. rouxii* en un medio de cultivo modificado

mediante la adición de HCl. En otro estudio, Restaino y col. (1983) encontraron que el crecimiento de *Z. rouxii* se inhibió a pH 1,5 evaluado bajo condiciones similares. Sin embargo, cuando el valor de pH se ajustó con ácido cítrico u otros tampones de citrato/fosfato, el valor mínimo de pH que permitió el crecimiento de *Z. rouxii* fue de 2,0 (Praphailong y Fleet, 1997; Membré y col., 1999). En el presente trabajo, la disminución en el pH se obtuvo mediante el tratamiento del jugo de uva con una columna de intercambio iónico. Este hecho pone en evidencia la importancia de evaluar el crecimiento de las levaduras alterantes en sustratos naturales utilizando métodos de acidificación normalmente empleados por la industria. Praphailong y Fleet (1997) concluyeron que 700 g/L de glucosa fue la mayor concentración de azúcar a la que *Z. rouxii* puede crecer. Este valor no es consistente con nuestros resultados, ya que la mayor concentración de azúcar evaluada en jugos de uva concentrados correspondió a 842 g/L (68 °Brix) y el crecimiento de *Z. rouxii* no fue afectado. Nuestros resultados están de acuerdo con otras investigaciones que han evidenciado el crecimiento de *Z. rouxii* a tan bajos valores de a_w como 0,650 (Legan y Voyset, 1991; Tokuoka, 1993). Por otra parte, Martorell y col. (2007) han informado que dos cepas de *Z. rouxii* aisladas a partir de jarabe alterado, fueron capaces de crecer en un medio que contenía 900 g/L de glucosa.

En el presente estudio se demostró, mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta, que el factor limitante principal que afecta el crecimiento de la levadura *Z. rouxii* fue el pH, principalmente cuando su valor fue inferior a 2,1. Recientemente, Vermeulen y col. (2012) estudiaron la influencia de los factores de estrés ambiental por sobre el límite de crecimiento/no crecimiento de *Z. rouxii*. Estos autores demostraron que una disminución del pH de 7,0 a 3,5 en relleno de chocolate presentaba un efecto leve en el tiempo de detección de las diferentes cepas de *Z. rouxii* evaluadas. Sólo los valores de pH inferiores a 2,5 tuvieron un efecto significativo en el tiempo de detección con un aumento de aproximadamente 4 a 40 días. Además, incluso en las condiciones más estrictas evaluadas (pH 5,0 y a_w 0,76), aún se pudo evidenciar desarrollo de *Z. rouxii* (Vermeulen y col., 2012). Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, donde el aumento de la concentración de azúcar no fue suficiente para inhibir el crecimiento de esta especie alterante de jugos de uva concentrados. Por otro lado, la disminución en los valores de pH de jugos de uva concentrados prolongaron el

tiempo necesario para que se produzca la alteración. Una extensión de la vida útil del producto durante más de 30 días, es una enorme ventaja comercial para la exportación del jugo de uva concentrado, ya que para entonces el producto debe haber llegado a su destino. Por otra parte, el tiempo para producir alteración estuvo por encima de 60 días cuando el pH fue inferior a 2,1 unidades, independientemente de la concentración de azúcar evaluada y de las condiciones de temperatura. También, el tiempo para evidenciar alteración de jugos de uva concentrados fue ligeramente inferior cuando se aplicó un perfil de temperatura variable que simulaban las condiciones de transporte. Esta observación puede deberse a las temperaturas extremas y oscilantes aplicadas durante la primera semana de ensayo, ya que esta drástica variación térmica produce la evaporación y subsiguiente condensación de agua en la superficie del producto, aumentando la a_w y promueve el inicio del crecimiento microbiano y por ende una más rápida aparición del defecto o alteración. También es importante tener en cuenta que el jugo de uva concentrado se inoculó con $1,2 \pm 0,2 \times 10^2$ ufc/mL, que representa el límite máximo para los hongos y levaduras aceptado por los mercados compradores (comunicación personal de las empresas elaboradoras). Esta situación inicial del ensayo representa el peor escenario, debido a que el jugo de uva concentrado contiene la población levaduriforme osmófila máxima tolerada en los estándares actuales de la industria. Por lo tanto, los datos presentados en este estudio representan el período mínimo de estabilidad microbiana para este sustrato, siendo seguramente mayores en la práctica.

El modelo aplicado en el presente estudio será de utilidad para las empresas concentradoras las cuales podrán estimar la vida útil del producto considerando las características propias del sustrato (pH y °Brix) y las condiciones de temperatura a las que será sometido el producto. De este modo podrán modificar los parámetros de pH y concentración de azúcar para prolongar la estabilidad del producto o conocer el tiempo en que el producto se mantendrá microbiológicamente estable hasta que llegue a destino.

III.5. Conclusiones de este capítulo

- ✓ La reducción del pH es el factor más importante para aumentar la estabilidad microbiológica de los jugos de uva concentrados.
- ✓ La reducción del pH de 3,2 a 2,1 en jugos de uva concentrados a 68 °Brix duplica el tiempo de estabilidad microbiana en ambas condiciones de temperatura.
- ✓ Valores de pH menores a 1,9 permiten lograr la inhibición completa de *Z. rouxii* en los jugos de uva concentrados y asegurar la estabilidad del producto durante su almacenamiento y transporte.
- ✓ La oscilación térmica (transporte) reduce la estabilidad microbiana de los jugos de uva concentrados.

Capítulo IV

Capítulo IV: “Evaluación de tratamientos térmicos para reducir la población de *Zygosaccharomyces rouxii* en jugos de uva concentrados”

IV.1. Hipótesis

- ✓ Distintas cepas de *Z. rouxii* presentan diferencias en la resistencia a elevadas temperaturas.
- ✓ La pasteurización reduce la población de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados y su eficiencia es dependiente de la relación temperatura/tiempo aplicada.

IV.2. Objetivos específicos

- ✓ Seleccionar la cepa de *Z. rouxii* más termo-resistente para emplearla en los ensayos de pasteurización.
- ✓ Reducir la población de *Z. rouxii* presente en jugos de uva concentrados aplicando un método físico como la pasteurización.

IV.3. Materiales y Métodos

IV.3.1. Evaluación de la pasteurización para reducir la población de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados

IV. 3.1.1. Selección de una cepa de *Z. rouxii* con mayor termo-resistencia

Se trabajó con 5 cepas de *Z. rouxii* (MR4, MT6, MC8, MC9, MC10) previamente aisladas e identificadas por técnicas de biología molecular, y seleccionadas por desarrollar y producir alteración en jugos de uva concentrados. Estas cepas fueron previamente adaptadas en un medio con alta concentración de azúcar y pH 4,5 (MYGF) (glucosa 195 g/L; 195 g /L de fructosa; 20 g /L de extracto de malta; 5 g/L de extracto de levadura). Se incubaron a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, cada cepa fue inoculada en jugo de uva concentrado a 68°Brix y pH 3,2, previamente tinalizados. Una vez que la alteración se hizo visible, es decir cuándo la población alcanzó 1×10^6 cél/mL, 2,5 mL del jugo de uva concentrado alterado fueron colocados en tubos de acero inoxidable de pared delgada, y se sometieron a un tratamiento de 60°C en baño de agua termostático aplicando distintos tiempos (2, 4, 6, 9, 12 y 15 minutos). El ensayo se realizó por triplicado. Paralelamente, en dos tubos con el mismo contenido se introdujeron termocuplas que permitieron conocer el momento exacto en que se alcanzaba la temperatura deseada y el mantenimiento de la misma durante el ensayo. Inmediatamente después de la aplicación de los distintos tratamientos, los tubos se colocaron en un baño de hielo para evitar que las elevadas temperaturas sigan ejerciendo su efecto letal sobre las células de la levadura. Para la evaluación de la supervivencia de las células, se sembraron cada una de las muestras por el método de siembra en superficie en medio WL Nutrient Agar (Oxoid Co.) previa dilución en agua glucosada al 30% en caso de ser necesario, y se incubaron a 28°C durante 72 horas. Con los datos obtenidos de los recuentos de células viables, se procedió al cálculo de las curvas de termo-resistencia aplicando el modelo de Geeraerd y col. (2000) para curvas de inactivación microbiana con cola mediante el software GInaFit 1.4.2 obteniendo los valores de Tiempo de reducción decimal (D: tiempo necesario para inactivar el 90% de la población). Los datos correspondientes a las réplicas para cada cepa fueron analizados en conjunto para obtener un mejor ajuste del modelo.

IV.3.1.2. Ensayos de pasteurización para reducir la población de la cepa de *Z. rouxii* más termo-resistente en jugos de uva concentrados.

Una muestra de jugo de uva concentrado a 68 °Brix y pH 3,2, previamente tindalizada, fue inoculada con una población de 1×10^6 cél/mL de una cepa de levadura *Z. rouxii* (MC8) previamente adaptada en medio MYGF (glucosa 195 g/L; 195 g /L de fructosa; 20 g /L de extracto de malta; 5 g/L de extracto de levadura) y seleccionada por presentar mayor termo-resistencia que el resto de las cepas de *Z. rouxii* previamente evaluadas. El jugo de uva fue incubado a 28°C hasta que la población de levaduras alcanzó 1×10^7 cél/mL y la alteración se hizo visible mediante la producción de gas y turbidez. Las muestras de jugos de uva concentrados fueron sometidas a tratamientos de pasteurización aplicando diferentes programas de temperatura (70; 72,5; 75; 80 y 85 °C)/tiempo (5, 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 segundos). Para lograr las temperaturas deseadas, se utilizó un baño de agua termostatzado. El ensayo se realizó por triplicado en tubos de acero inoxidable de pared delgada, para lograr una eficiente y rápida transmisión del calor, con 2,5 mL de jugo concentrado alterado con la cepa MC8. Paralelamente, se introdujeron termocuplas en dos tubos con el mismo contenido que permitieron conocer el momento exacto en que se alcanzó la temperatura deseada. Inmediatamente después de la aplicación de los distintos tratamientos, se colocaron los tubos en un baño de hielo para evitar que las elevadas temperaturas sigan ejerciendo su efecto letal sobre las células de la levadura. Para la evaluación de la supervivencia de las células, cada una de las muestras fue sembrada en superficie en medio WL Nutrient Agar (Oxoid Co.), previa dilución en agua glucosada al 30% en caso de ser necesario, y se incubaron a 28°C durante 72 horas. Con los datos obtenidos de los recuentos de células viables se construyeron las curvas de las levaduras sobrevivientes (Log ufc/mL) en función del tiempo. Las curvas fueron ajustadas utilizando dos modelos diferentes:

1) **El modelo bifásico** (Cerf, 1977) disponible en el software GInaFit 1.4.2. que presenta la siguiente ecuación:

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) + \log_{10}(f * e^{(-k_{max1} * t)} + (1-f) * e^{(-k_{max2} * t)}) \quad (1)$$

Donde,

N: es la población de sobrevivientes en un tiempo dado

N_0 : es la población inicial

K_{max1} : es la pendiente en la primera fase de la curva

K_{max2} : es la pendiente en la segunda fase de la curva

t: tiempo

f: es la fracción de la población original en el grupo mayor

2) **El Modelo Doble Weibull Simplificado** (Coroller y col., 2006) que presenta la siguiente ecuación:

$$\text{Log } N_t = \text{Log} \left\{ (N_0 / (1 + 10^\alpha)) * [10^\alpha - (t/\delta_1)^p + 10 - (t/\delta_2)^p] \right\} \quad (2)$$

Donde,

N_t : es la población de sobrevivientes en un tiempo dado

N_0 : es la población inicial

p: es el parámetro de forma (donde $p > 1$ para las curvas convexas bifásicas no lineales y $p = 1$ para las curvas bifásicas lineales y $p < 1$ para curvas cóncavas bifásicas no lineales)

δ : es el tiempo para la primera reducción decimal (los subíndices 1 y 2 indican dos subpoblaciones diferentes donde la subpoblación 1 es más sensible que la subpoblación 2 por lo tanto $\delta_1 < \delta_2$).

α : es el parámetro que incluye la relación de las fracciones de cada su población y es un derivado del parámetro f originalmente propuesto para el modelo de Weibull.

Los valores para α varían entre 4 y 6.

t: tiempo

IV.4. Resultados y Discusión

IV.4.1. Evaluación de la pasteurización para reducir la población de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados

IV.4.1.1. Selección de una cepa *Z. rouxii* con mayor termo-resistencia

Las curvas de supervivencia (termo-resistencia) obtenidas para las 5 cepas de *Z. rouxii* evaluadas después de someterlas a un tratamiento de 60°C en diferentes tiempos se muestran en la figura IV.1. Se observó que las 5 cepas presentaron diferentes curvas de termo-resistencia en jugos de uva concentrados a 68°Brix y pH 3,2. Estas curvas mostraron una primera fase de muerte seguida de un aplanamiento en la curva donde la pendiente tiende a “0” (denominada “curva con cola”). Este tipo de curva supone que existe una sub-población sensible la cual muere rápidamente, mientras que una fracción de la misma es más resistente, donde las células sobrevivientes permanecen viables aun en largas exposiciones a esta temperatura. Los mecanismos por los cuales el calor inactiva a los microorganismos son muy variados y dependen de la magnitud de la temperatura aplicada (Frazier y Westhoff, 1993).

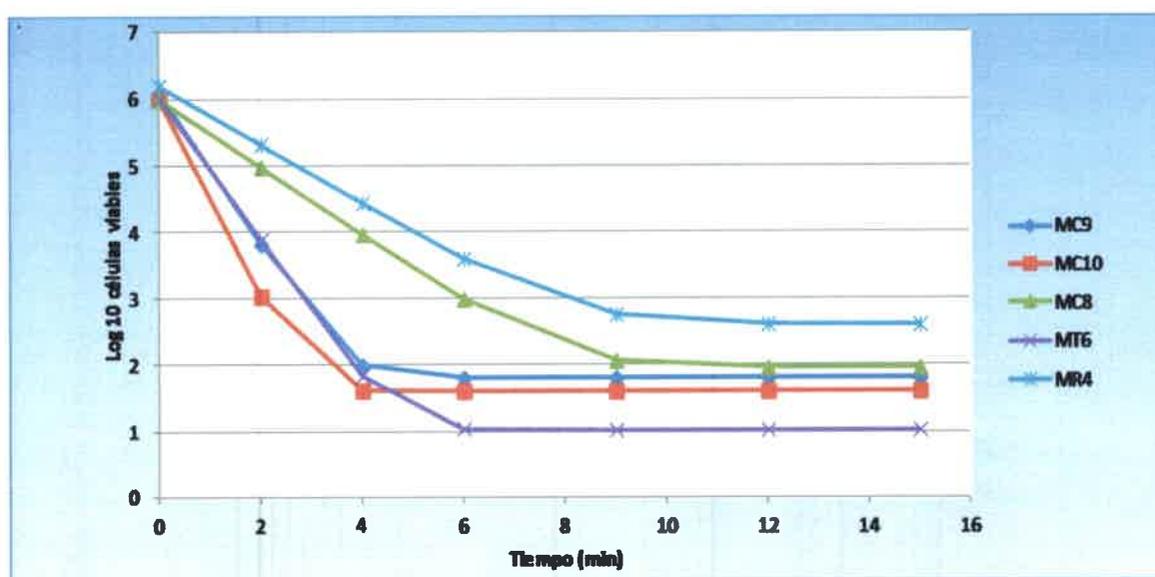


Figura IV.1. Curvas de supervivencia de distintas cepas de *Z. rouxii* a 60°C en jugos de uva concentrados a 68°Brix y pH 3,2

En este caso, la temperatura fue moderada (60°C) y la misma podría haber desencadenado mecanismos de inactivación sobre algunas de las células las cuales mueren en la primera fase de la curva y mientras que otra fracción de la población fue capaz de resistir este estrés, reparando el daño y por lo tanto sobreviviendo a este tratamiento.

Una forma de medir la termo-resistencia de un dado microorganismo es el valor D, el cual se define como el tiempo necesario para reducir 10 veces la población a una temperatura y sustrato determinado. Los valores D fueron calculados para curvas con cola aplicando el modelo de Geeraerd y col. (2000) utilizando el software GInaFit 1.4.2. Los resultados que se muestran en la tabla IV.1 demuestran que las cepas MT6 y MC10 presentaron menor tiempo necesario para inactivar el 90% de la población, la cepa MC9 un valor intermedio, mientras que las cepas MR4 y MC8 presentaron un mayor valor D. Se seleccionó la cepa MC8 la cual presentó elevada termo-resistencia y un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales.

Tabla IV.1. Parámetros de termo-resistencia de distintas cepas de *Z. rouxii* obtenidos a 60 °C en jugos de uva concentrados a 68 °B y pH 3,2.

Cepa	k*	D**(min)	R ²
MC9	2,62	0,38	0,94
MC10	3,44	0,29	0,64
MC8	1,17	0,85	0,73
MT6	4,26	0,23	0,91
MR4	1,14	0,88	0,69

*k: pendiente obtenida según modelo de regresión lineal con cola (Geeraerd y col, 2000), **D: 1/k

IV.4.1.2. Ensayos de pasteurización para reducir la población de la cepa *Z. rouxii* más termo-resistente en jugo de uva concentrado

Las curvas de supervivencia de la cepa de *Z. rouxii* MC8 en jugo de uva concentrado sometido a diferentes programas de pasteurización fueron construidas con los datos experimentales de cada replica de manera independiente. Las curvas fueron ajustadas aplicando dos modelos de inactivación diferentes para evaluar cual explicaba mejor los datos obtenidos y permitía obtener valores y recomendaciones que pudieran ser aplicadas en la industria.

Cerf (1977) fue el primero que propuso un modelo basado en la hipótesis de la coexistencia de dos sub-poblaciones microbianas con diferentes resistencias al estrés que siguen un decrecimiento log lineal. Siguiendo este razonamiento, la curva de muerte de ciertos microorganismos puede describirse por un modelo doble exponencial. Este modelo es conocido como modelo bifásico y fue el primer modelo aplicado a nuestros datos. Las curvas obtenidas con el modelo para las diferentes temperaturas obtenidas se muestran en la figura IV.2.

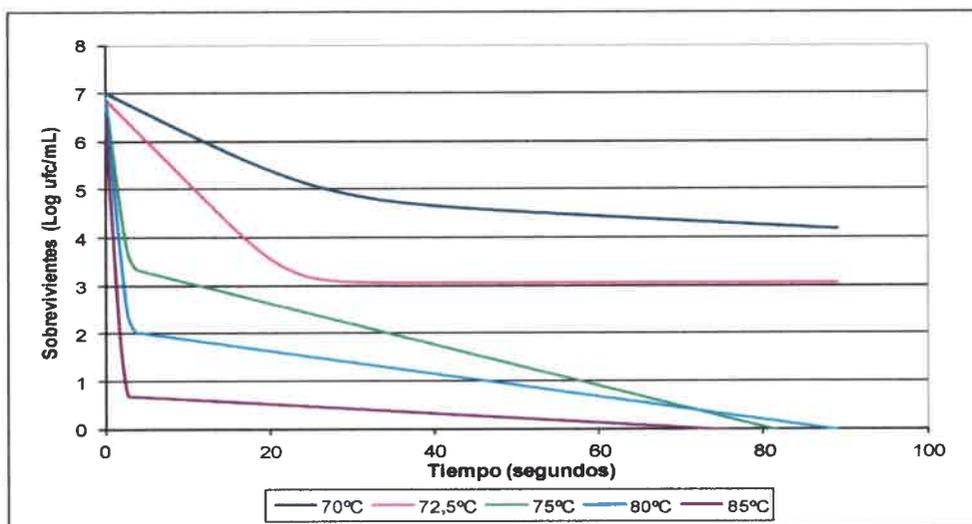


Figura IV.2. Curvas de supervivencia de la cepa *Z. rouxii* MC8 en jugo de uva concentrado 68 °Brix y pH 3,2 obtenidas por ajuste de datos experimentales al modelo bifásico (Cerf, 1977)

El tiempo de reducción decimal (D) se calcula como la inversa de la pendiente y representa el tiempo necesario para reducir la población 10 veces a una temperatura dada. La aplicación del modelo bifásico calcula dos constantes k_1 y k_2 las que corresponden a las pendientes en cada fase de la curva. Los valores D para cada temperatura se muestran en la tabla IV.2.

Tabla IV.2. Parámetros de termo-resistencia obtenidos a distintas temperaturas de la cepa MC8 de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados a 68 °Brix y pH 3,2 según el modelo bifásico (Cerf, 1977)

Temperatura (°C)	k_1^*	k_2^*	D_1^{**} (seg)	D_2^{**} (seg)
70	0,20	0,0200	5,00	50
72,5	0,40	0,0001	2,50	10000
75	3,06	0,1000	0,33	10
80	4,09	0,0600	0,24	17
85	6,00	0,0200	0,17	50

* k : son las pendientes obtenidas según modelo bifásico (Cerf, 1977), **D: $1/k$

Los valores de la primera reducción decimal (D_1) corresponden a la subpoblación más sensible y los valores de la segunda reducción decimal (D_2) corresponden a la subpoblación más resistente. Los valores de D_1 muestran un valor decreciente del tiempo para reducir 10 veces a la subpoblación más sensible a medida que las temperaturas aumentan. Estos valores no pueden ser utilizados para realizar una recomendación a la industria debido a que las subpoblaciones más resistentes no están consideradas en este coeficiente. Por lo tanto, el valor de D_2 representaría el valor de referencia para una recomendación a la industria. Pero, como se observa en la tabla IV.2 estos valores no muestran una coherencia entre la termo-resistencia de las células y las temperaturas aplicadas. Este hecho puede deberse a que los datos experimentales de la segunda parte de la curva correspondientes a las subpoblaciones de levaduras resistentes no fueron adecuadamente ajustados con el modelo log lineal bifásico aplicado. Por lo tanto se procedió a aplicar un segundo modelo que tuviera esta consideración en cuenta. El modelo que se aplicó se denomina Doble Weibull Simplificado (Coroller y col., 2006).

En la figura IV.3 se muestra el ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos a las distintas temperaturas de pasteurización. Los valores de las constantes y el ajuste del modelo se muestran en la tabla IV.3.

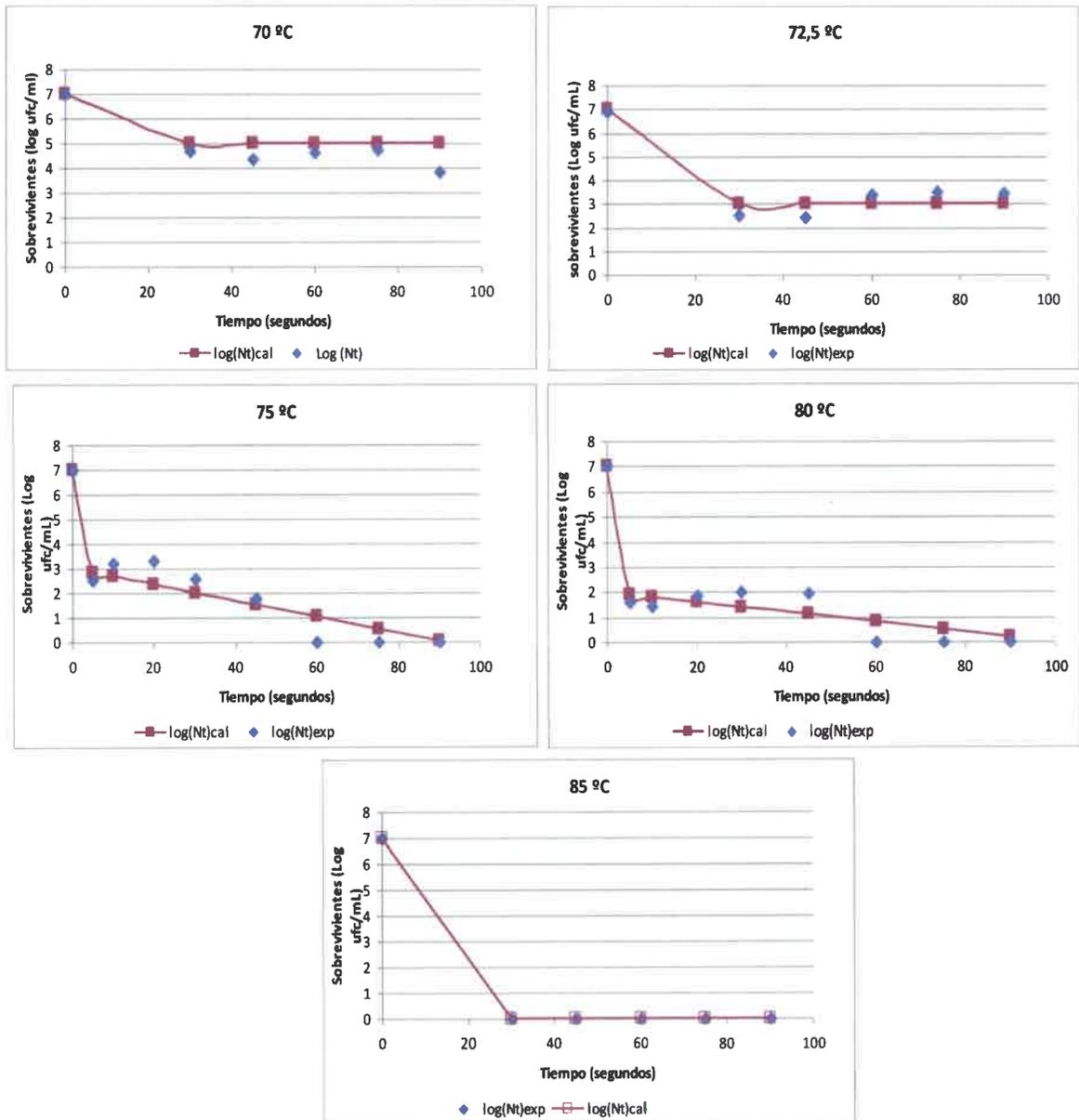


Figura IV.3. Curvas de supervivencia de la cepa *Z. rouxii* MC8 en jugo de uva concentrado 68 °Brix y pH 3,2 obtenidas por ajuste de datos experimentales al modelo Doble Weibull Simplificado (Coroller y col., 2006).

Tabla IV.3. Parámetros de termo-resistencia obtenidos a distintas temperaturas de la cepa MC8 de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados a 68 °B y pH 3,2 según el modelo de Doble Weibull Simplificado (Coroller y col., 2006).

Temperaturas (°C)	α (Log ufc/mL)	δ_1 (segundos)	δ_2 (segundos)	R^2
70	2	5 E-6	1 E5	0,91
72,5	4	5 E-6	1 E5	0,91
75	4	5 E-6	6	0,93
80	5	1 E-9	6	0,94
85	7	1 E-9	1 E5	1,00

La ventaja de aplicar este modelo es que los parámetros estimados pueden ser interpretados directamente desde el gráfico. A modo de ejemplo y para facilitar la interpretación de nuestros resultados se muestra una figura de la publicación original de Coroller y col. (2006).

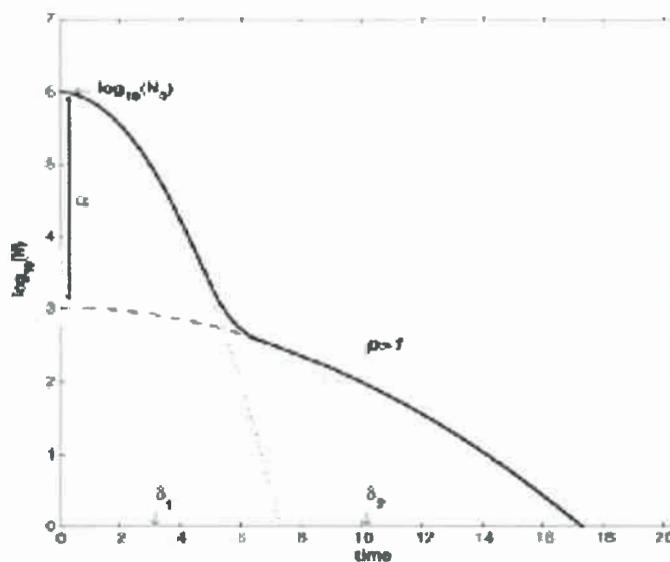


Figura IV.4. Curva de supervivencia de células bacterianas basada en el Modelo Doble Weibull Simplificado. Extraída de Coroller y col., 2006.

En la figura IV.4 podemos observar que: N_0 es la población inicial, δ_1 es tiempo para la primera reducción logarítmica de cada subpoblación, α está definida como el log de f y es equivalente a $\alpha = \text{Log}(N_{01}/N_{02})$ y α es un valor cercano a la diferencia en el gráfico entre $\text{Log}(N_0)$ y el Log del tamaño de la población en el punto de inflexión observado.

Teniendo en cuenta estas referencias y analizando las curvas obtenidas podemos decir que en nuestros ensayos existió una subpoblación termo-sensible la cual rápidamente murió en todas las temperaturas evaluadas como lo evidencia el valor δ_1 (tabla IV.3). Esta fracción de la población más termo-sensible fue diferente dependiendo de la temperatura empleada. Así, para las menores temperaturas (70 y 72,5 °C) fue de 2 y 4 logaritmos, respectivamente, dejando una población residual de 5 y 3 logaritmos las cuales fueron resistentes a estas temperaturas durante el tiempo del ensayo, mostrando un valor de δ_2 muy grande (tabla IV.3). Por lo tanto, estas dos temperaturas no resultaron letales para *Z. rouxii* MC8. A partir de valores de temperatura de 75°C la subpoblación más resistente fue menor a medida que aumentó la temperatura del tratamiento, mostrando una fracción nula de células termo-resistentes a partir de los 85°C, donde el valor α fue igual al valor de la población total inicial, es decir no existió una sub-población resistente a esta temperatura (tabla IV.3). Por otro lado, se observó que a 75 y 80°C fue necesario un tiempo de 6 segundos para obtener una reducción decimal de las sub-poblaciones más termo-resistentes, indicando que estas temperaturas estarían afectando la viabilidad de las células. Es importante aclarar que el valor elevado de δ_2 estimado por el modelo para la temperatura de 85°C se debe a que la población había sido completamente inactivada y la curva se mantiene en el valor "0".

De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que la aplicación de temperaturas menores a 72,5 °C no resultan letales para las poblaciones de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados. Temperaturas por encima de 75°C puede aplicarse para la pasteurización de este producto, obteniendo una reducción de 7 logaritmos luego de 90 segundos de tratamiento para las temperaturas de 75 y 80°C, y luego de 30 segundos para temperaturas superiores a 85°C.

Existen escasos trabajos sobre las temperaturas para inactivar especies de *Zygosaccharomyces* en jugos de frutas (Reyns y col., 2000). Un estudio realizado por Tchango y col., (1997) evaluaron la termo-resistencia de dos especies de levaduras comúnmente alteradoras de jugos de frutas tropicales como son *Kloeckera apis* y *Candida pelliculosa*. Los autores encontraron que el valor de reducción decimal (D_t) obtenido a una dada temperatura fue dependiente de la especie de levadura y del jugo donde fuera evaluado, así los tiempos de reducción decimal (D) obtenidos para *K. apis* a 55 y 60 °C variaron entre 1,41 y 2,49 minutos, y para *C. pelliculosa* a 60 y 75 °C la variación fue de 1,03 hasta 4,90 minutos, por otro lado *C. pelliculosa* presentó mayor resistencia al calor que *K. apis*. Como se observa en nuestros resultados, los tiempos necesarios para lograr la reducción decimal son menores a los obtenidos por estos autores y remarca la importancia de obtener valores de D para cada especie de levadura en la matriz o alimento donde se pretende aplicar el tratamiento térmico.

Panagou y col. (2002) estudiaron la resistencia al calor del hongo Ascomycete *Monascus ruber* tradicionalmente usado en países asiáticos en la producción de colorantes para alimentos, en alimentos fermentados y bebidas. *Monascus ruber* fue aislado de aceitunas verdes procesadas térmicamente. Los parámetros de muerte térmica de las ascosporas fueron determinados en buffer fosfato (pH 7,0), buffer citrato (pH 4,0) y salmuera (pH 3,8) usando el modelo primario de Baranyi. Los valores de tiempos de reducción decimal (D) a 70, 75 y 80 °C en buffer fosfato fueron de 37,31; 7,14 y 1,66 minutos respectivamente. En buffer citrato los valores fueron de 38,61; 7,83 y 2,20 minutos y en salmuera, los valores fueron 46,08; 4,91 y 0,88, y 72,99; 7,98 y 7,04 minutos para concentraciones de ClNa de 5,6 y 10,5%, respectivamente. Panagou y col. (2002) encontraron que existen diferencias en los valores de D entre las salmueras y las soluciones buffers. A 70 °C, los valores de D en ambas salmueras fueron mayores que a los correspondientes buffers, pero a 80 °C, fue observado lo opuesto. Parece que el efecto protector de ClNa es mayor a temperaturas de calentamiento más bajas, pero con el aumento de la temperatura, esta protección se reduce. Por otro lado, Jay (1996) en uno de sus estudios sugirió que sales como el ClNa pueden disminuir la a_w y, consecuentemente, incrementar la resistencia al calor.

Teniendo en cuenta que la industria fija un valor arbitrario de 12 reducciones decimales para considerar la absoluta muerte térmica (esterilidad industrial) (ICMSF, 1980), podríamos entonces sugerir un programa para la pasteurización de jugos de uva concentrados de la siguiente manera (tabla IV.4):

Tabla IV.4. Programas de pasteurización sugeridos a la industria del jugo de uva concentrado para lograr la esterilidad industrial.

Temperatura	Tiempo
75°C	180 segundos
80°C	180 segundos
85°C	60 segundos

Así como los modelos primarios describen las curvas de supervivencia en condiciones isotérmicas, los modelos secundarios describen la dependencia de la temperatura a los parámetros del modelo primario.

El valor z es uno de los parámetros más frecuentemente calculados para evidenciar la dependencia entre el valor D y la temperatura. La utilidad de estos parámetros basados en modelos log lineal, nos lleva a cuestionar que sucede si las curvas de inactivación no son log lineales. El valor de z depende del modelo primario aplicado y del número de puntos utilizados para calcular z . Si el valor z es dudoso, la validación del cálculo de esterilidad basado en él también lo es (Peleg y col., 2002).

Cuando las curvas de supervivencia térmica son descriptas por modelos que siguen la distribución de Weibull la dependencia con la temperatura puede ser explicada por el valor $b(t)$ aplicando un modelo log logístico, que asume la forma de

$$b(T) = \log e \{1 + e [k(T-T_c)]\}^m \quad (3)$$

Donde,

T_c marca el valor de temperatura donde la inactivación comienza a acelerarse
 k la velocidad (con respecto a la temperatura) donde $b(t)$ aumenta como la temperatura
 asciende a un nivel bien por encima de T_c
 m es una constante que determina la concavidad de la curva cuando la relación de $b(t)$
 vs T no es lineal.

A diferencia de otros modelos secundarios tradicionales y debido a que $b(t)$ no está
 expresado como una transformación logarítmica, las temperaturas letales reciben su
 adecuado peso relativo incluso en bajas temperaturas, donde ocurre poco y nada de
 inactivación. Además como el modelo se deriva de la dependencia de $b(t)$ con la
 temperatura observada y es tratado empíricamente, no es necesario probar las
 asunciones en las cuales los modelos tradicionales se basan, eliminando los problemas
 teóricos y sus implicancias (Peleg, 2006)

En la figura IV.5 se presenta la curva que relaciona los valores de $b(t)$ en función de
 las temperaturas evaluadas.

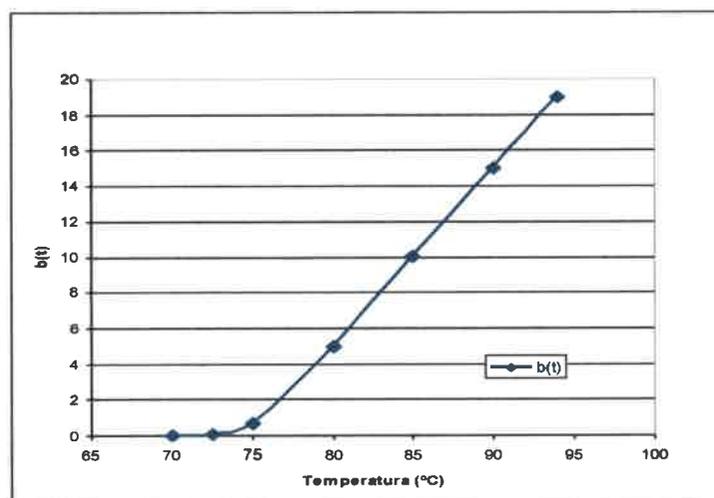


Figura IV.5. Curva que relaciona los valores de $b(t)$ con las temperaturas evaluadas según el modelo secundario Log logístico (Peleg y col., 2002)

De acuerdo a este modelo cuando $b(t)$ es prácticamente cero la temperatura no es letal (Peleg, 2006). La aplicación de este modelo a nuestros resultados muestra que

temperaturas menores a 72,5 presentan valores de $b(T)$ iguales a “0” confirmando que las mismas no son letales para *Z. rouxii* en jugo de uva concentrado. Deben superarse los 75°C para observar que a medida que aumenta la temperatura aumentan los valores de $b(t)$.

Es importante considerar que las curvas de muerte térmica mostradas anteriormente fueron construidas con microorganismos capaces de desarrollar en un medio de cultivo no selectivo (WL), donde la ausencia de células viables en un mililitro, no significa “esterilidad absoluta” ya que pueden estar presentes en mayores volúmenes de muestra (por ejemplo 1 célula en 100 ml) o estar presente en un estado “viables pero no cultivables” (VBNC) de las células (Millet y col, 2000). Las levaduras luego del tratamiento térmico podrían presentar un daño subletal que no le permitiría multiplicarse en el medio de cultivo, pero el cual podría ser reparado y revertido al retirar el agente estresante y/o permanecer en un medio rico. Para evaluar si esto ocurría en nuestro ensayo, las muestras de jugo de uva concentrado luego del tratamiento térmico fueron incubadas en estufa a 23°C y monitoreadas durante 7 meses. Ninguna de las muestras tratadas con calor evidenció alteración después de este largo período de seguimiento, validando los resultados obtenidos mediante el recuento de células viables.

IV.5. Conclusiones de este capítulo

- ✓ Diferentes cepas de *Z. rouxii* presentan distintas termo-resistencia.
- ✓ El modelo doble Weibull simplificado resultó apropiado para ajustar curvas de muerte térmica que presenten dos poblaciones con diferente termo-resistencia.
- ✓ La pasteurización fue eficiente para reducir las poblaciones de *Z. rouxii* en jugo de uva concentrado.
- ✓ Los programas de pasteurización de jugos de uva concentrados que se sugieren para alcanzar la esterilidad industrial son: 75 °C durante 180 segundos; 80 °C durante 180 segundos o 85 °C durante 60 segundos.

Capítulo V

Capítulo V: “Evaluación de diferentes conservantes químicos para controlar el crecimiento de *Z. rouxii* en un medio de cultivo con alta concentración de azúcar”

V.1. Hipótesis

- ✓ Algunos compuestos químicos conservantes pueden controlar el desarrollo de *Z. rouxii* en un medio con elevada concentración de azúcar.

V.2. Objetivo específico

- ✓ Inhibir el crecimiento de *Z. rouxii* en un medio de cultivo con elevada concentración de azúcar utilizando conservantes químicos naturales y sintéticos.

V.3. Materiales y Métodos

V.3.1. Cepas de levadura

Un cóctel de cinco cepas pertenecientes a la especie *Z. rouxii* (MR4, MT6, MC8, MC9 y MC10) previamente aisladas de jugos de uva concentrados argentinos fueron utilizados en el presente estudio (ver tabla II.1, cap.II).

V.3.2. Preparación del inóculo de levaduras

En primer lugar, las cinco cepas de *Z. rouxii* crecieron de manera independiente durante 24 horas a 28 °C en caldo YPD (glucosa 40 g/L; 5 g/L de peptona bacteriológica; extracto de levadura 5 g/L y 20 g/L de agar). Una vez transcurrido este período, cada cepa de *Z. rouxii* fue inoculada en un medio de cultivo con elevado contenido de azúcar MYGF (glucosa 195 g/L; 195 g /L de fructosa; 20 g /L de extracto de malta; 5 g/L de extracto de levadura). El pH fue ajustado a 4,5 mediante la adición de ácido cítrico. Se inocularon las diferentes cepas para formar un cóctel de aproximadamente una población de 10^4 ufc/mL. Finalmente, las levaduras se incubaron durante 48 horas a 28 °C sin agitación hasta que la población de levaduras alcanzó 2×10^7 ufc/mL.

V.3.3. Modelado de los efectos individuales de los distintos conservantes químicos en el crecimiento de un cóctel de *Z. rouxii*

El efecto de los conservantes sobre un cóctel de diferentes cepas de *Z. rouxii* se estudió usando MYGF (glucosa 195 g/L; 195 g /L de fructosa; 20 g /L de extracto de malta; 5 g/L de extracto de levadura) como medio basal suplementado con diferentes dosis de los siguientes compuestos químicos: sorbato potásico (Sigma-Aldrich Co., San Luis, Estados Unidos), benzoato sódico (Sigma- Aldrich Co.), dimetildicarbonato (DMDC) (Velcorin®), vainillina (Sigma-Aldrich Co.), sales de quitosano (Lallemand Co.) y diferentes ácidos hidroxicinámicos tales como ácido ferúlico , ácido p-cumárico y cafeico (Sigma-Aldrich Co.). Los tres primeros conservantes químicos fueron seleccionados teniendo en cuenta los productos aprobados por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2013) y el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, Argentina), mientras que los últimos conservantes fueron seleccionados por su carácter natural y sus actividades antimicrobianas prometedoras para la industria

alimenticia. La tabla V.1 muestra los rangos probados para cada compuesto inhibidor utilizado y sus respectivas soluciones stock. Las unidades que se adoptaron para expresar las concentraciones de los conservantes, se seleccionaron de acuerdo con la unidad que se utiliza con más frecuencia para cada compuesto con el fin de facilitar la interpretación de los datos y sus comparaciones con otros trabajos.

Tabla V.1. Rangos de concentración de los conservantes químicos evaluados.

Conservantes*	Concentraciones evaluadas
Sorbato potásico	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 mg/L
Benzoato sódico	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 mg/L
Sales de Quitosano	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 200, 300 mg/L
Dimetildicarbonato (DMDC)	0, 357, 536, 714, 893, 1071, 1250, 1429, 1607, 1786, 1964, 2143, 2321 mg/L
Vainillina	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 mM
Acido cafeico	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 mM
Acido ferúlico	0,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 mM
Acido p-cumárico	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 mM

* Una solución Stock para cada conservante fue preparada excepto para DMDC (99,9 % de pureza) que fue adicionado directamente. Para el sorbato de potasio y el benzoato de sodio la solución madre fue de 17,500 mg/L en agua estéril, para las sales de quitosano fue de 2 g/L en etanol, para la vainillina 0,7 M en etanol, y para los ácidos hidroxycinámicos fue de 0,35 M en etanol.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de microtitulación utilizando un espectrofotómetro automático llamado Bioscreen C (Labsystem, Finlandia) (Figura V.1). Este espectrofotómetro utiliza dos placas de microtitulación con 100 pocillos cada uno. Por lo tanto, 200 ensayos se llevaron a cabo de manera simultánea. En los pocillos de la microplaca se colocaron 350 µL de MYGF medio suplementado con diferentes

dosis de los conservantes químicos (Tabla V.1) y 20 μL de inóculo del cóctel de levaduras crecidas en MYGF logrando una población inicial de 1×10^6 ufc/mL en el medio de ensayo. Las poblaciones estuvieron siempre por encima del límite de detección del equipo, que se determinó por comparación con una curva de calibración previamente establecida. Los pocillos controles sin el conservante también fueron incluidos en la placa de microtitulación para cada serie experimental. Por lo tanto, se obtuvieron 273 curvas de crecimiento (13 niveles de cada conservante \times 7 conservantes \times 3 repeticiones). Los ensayos se llevaron a cabo a 28°C y las mediciones de densidad óptica (DO) se realizaron después de una pre-agitación de 20 segundos cada 2 horas durante 7 días.



Figura V.1. Espectrofotómetro Bioscreen C, utilizado para el ensayo.

El análisis de resultados se realizó considerando que a medida que aumenta la cantidad de inhibidor, el efecto sobre el crecimiento del microorganismo también debería aumentar. Este efecto sobre el crecimiento se manifiesta por una reducción en el área bajo la curva de densidad óptica en función del tiempo en relación con el control (ausencia de conservante). Las áreas bajo las curvas de densidad óptica en función del tiempo se calcularon mediante el uso de software OriginPro 7,5 (OriginLab Co.). El valor relativo del crecimiento para cada concentración de conservante, fue indicado como el área fraccional (af), y se obtuvo utilizando las relaciones de la zona de ensayo

con diferentes dosis de cada conservante químico ($area_{test}$) en relación al control sin conservante ($area_{cont}$), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$af = (area_{test}) / (area_{cont}) \quad (1)$$

El porcentaje de reducción de crecimiento (Gr) se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Gr = (1 - af) \times 100 \quad (2)$$

Este parámetro tiene la premisa de que en ausencia del conservante el crecimiento del microorganismo es máximo y el área fraccional en consecuencia es igual a 1. Por lo tanto, el porcentaje de reducción del crecimiento será igual a 0.

El porcentaje de reducción del crecimiento en función de la concentración del conservante produjo una curva de forma sigmoidea cuyos datos pudieron ser ajustados con la ecuación de Gompertz reparametrizada propuesta por Zwietering y col. (1990), que tiene la siguiente expresión:

$$Gr = A \cdot \exp(-\exp\{(\mu \cdot e \cdot (\lambda - x)) / A + 1\}) \quad (3)$$

Donde,

x es la concentración de conservante ensayada ,

A es la máxima reducción del crecimiento alcanzada,

μ es la tasa máxima de cambio y,

λ es la concentración de conservante antes del comienzo de la reducción del crecimiento.

Estos parámetros se obtuvieron mediante un procedimiento de regresión no lineal, lo que minimiza la suma de los cuadrados de la diferencia entre los datos experimentales y el modelo ajustado, es decir, la función de pérdida (valor observado en función al valor de referencia). Esta tarea se realizó utilizando el paquete de software 7,0 Statistica (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EE.UU.). El ajuste de los datos experimentales se comprobó mediante el análisis de la varianza explicada por el modelo (R^2).

Por último, el análisis de la varianza se realizó por medio del módulo de ANOVA utilizando el software Statistica 7.1 para comprobar si hay diferencias significativas entre los parámetros de ajuste obtenidos a partir de las diferentes dosis de conservantes evaluados. Para este propósito, el análisis comparativo se realizó mediante la prueba de LSD de Fisher.

V.4. Resultados y Discusión

En el presente estudio, el efecto individual de siete conservantes químicos fue evaluado en el crecimiento de un cóctel de *Z. rouxii* en un medio de cultivo con elevado contenido de azúcar. El estudio se realizó utilizando un espectrofotómetro automatizado mediante el cual se obtuvieron un total de 273 curvas de crecimiento (densidad óptica en función del tiempo) las cuales fueron analizadas posteriormente.

El modelado matemático de los datos experimentales de las curvas de crecimiento presentó un buen ajuste y siempre tuvieron un valor de R^2 por encima de 0,90.

Las concentraciones de quitosano (Lallemand Co.) evaluadas no presentaron ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Z. rouxii*, por lo tanto, no se incluyó en el análisis de los resultados. Ninguno de los conservantes evaluados fue capaz de inhibir completamente el crecimiento del cóctel de *Z. rouxii* en ninguna de las concentraciones. Sin embargo, todos los conservantes químicos fueron capaces de inhibir al menos parcialmente el crecimiento de las levaduras. La figura V.2 muestra un ejemplo, del ajuste con la ecuación de Gompertz reparametrizada para una de las tres replicas obtenido para los datos experimentales del porcentaje de reducción de crecimiento del cóctel de *Z. rouxii* en función de diferentes concentraciones de sorbato potásico y

benzoato sódico. Es evidente que la curva en forma sigmoidea se puede dividir en tres secciones: i) una primera sección que corresponde a la concentración de conservantes con porcentaje de inhibición del crecimiento alrededor de 0, ii) las concentraciones de conservantes por encima del cual el porcentaje de reducción de crecimiento aumentó progresivamente, y iii) una tercera sección en la que se obtuvo el porcentaje máximo de reducción.

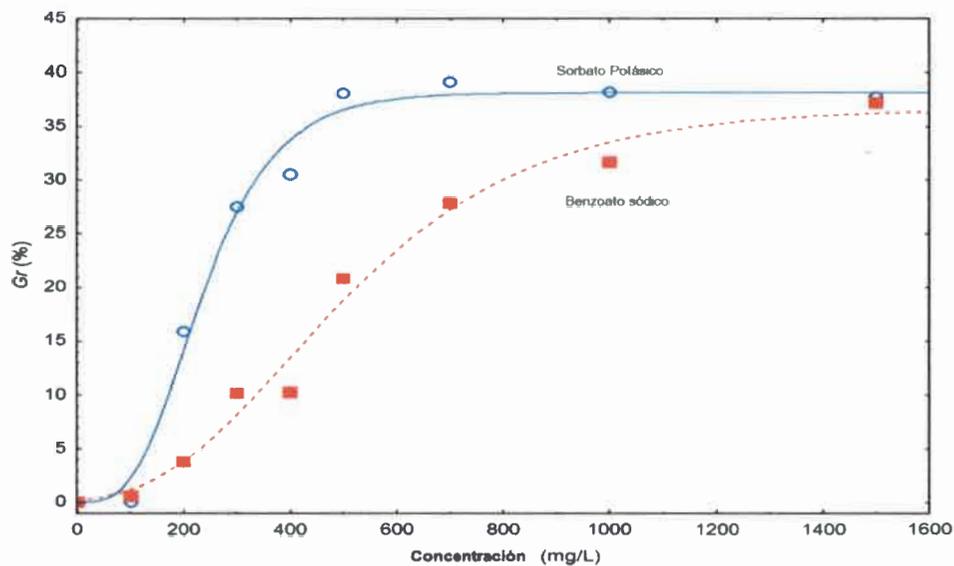


Figura V.2. Ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Gompertz reparametrizada para la reducción del crecimiento (Gr) que se deducen de las af obtenidas para distintas concentraciones el sorbato potásico y de benzoato sódico.

La tabla V.2 muestra los parámetros obtenidos para los diferentes conservantes químicos. El parámetro A, que muestra el porcentaje máximo de reducción del crecimiento obtenido, varió de 14,8 % (ácido p- cumárico) a 39,9 % (vainillina). Este parámetro no tiene ninguna relación con las unidades del conservante (mg/L o mM), y, en consecuencia, es el parámetro más apropiado para hacer comparaciones entre los diferentes efectos inhibitorios de los conservantes. Sin embargo, los parámetros como λ o μ tienen relación con las unidades de concentración de conservantes y por lo tanto la comparación de ambos parámetros sólo pueden llevarse a cabo entre los conservantes con las mismas unidades. De este modo, los conservantes cuya unidad es mg/L, tuvieron valores de λ que van desde 12,4 mg/L (DMDC) a 169,8 mg/L (benzoato de

sodio), mientras que μ varió de $0,08 \text{ mg/L}^{-1}$ para el benzoato de sodio a $1,59 \text{ mg/L}^{-1}$ para el DMDC. En el caso de los conservantes con unidades en mM, λ varió de $1,2 \text{ mM}$ (ácido ferúlico) a $6,7 \text{ mM}$ (ácido cafeico), mientras que μ varió de $0,59 \text{ mM}^{-1}$ para el ácido cafeico a $3,58 \text{ mM}^{-1}$ para el ácido ferúlico (Tabla V.2).

Tabla V.2. Parámetros A (reducción máxima de crecimiento de la levadura), μ (tasa máxima de cambio) y λ (concentración el conservante por encima de la cual se inicia la reducción del crecimiento) obtenido a partir de la ecuación de Gompertz reparametrizada para los distintos conservantes químicos ensayados.

Conservante	Unidades	A \pm DS *	$\mu \pm$ DS	$\lambda \pm$ DS
		(%)	(Gr conc ⁻¹)	(conc.)
DMDC	mg/L	$39,62 \pm 1,63^a$	$1,593 \pm 0,21$	$12,45 \pm 2,52$
Benzoato sódico	mg/L	$35,69 \pm 1,83^a$	$0,078 \pm 0,021$	$169,83 \pm 32,60$
Sorbato potásico	mg/L	$39,70 \pm 1,82^a$	$0,137 \pm 0,013$	$79,86 \pm 32,40$
Ácido ferúlico	mM	$29,45 \pm 2,89^b$	$3,586 \pm 0,910$	$1,23 \pm 1,18$
Ácido cafeico	mM	$16,49 \pm 6,40^c$	$0,595 \pm 0,049$	$6,67 \pm 3,11$
Vainillina	mM	$39,98 \pm 1,69^a$	$2,813 \pm 0,136$	$1,87 \pm 1,72$
Ácido cumárico	mM	$14,86 \pm 1,97^c$	$2,205 \pm 1,689$	$4,95 \pm 4,31$

* Los valores seguidos por diferentes letras de superíndice son significativamente diferentes de acuerdo con una prueba de comparación de Fisher-LSD.

De los parámetros de ajuste, es posible obtener las ecuaciones de predicción para estimar cómo se reduce el crecimiento de *Z. rouxii* en función de las diferentes concentraciones de conservantes evaluadas. Estas ecuaciones se muestran en la tabla V.3, mientras que una representación gráfica de ellas se muestra en la figura V.3.

Tabla V.3. Ecuaciones predictivas para la reducción de crecimiento de *Z. rouxii* en función de la concentración de conservante. Los parámetros estimados de la ecuación se calcularon como valores medios obtenidos a partir de tres experimentos.

Conservante	Unidades	Ecuaciones
DMDC	mg/L	$y=(39,62)*(\exp(-\exp(((1,593)*2,718282)/(39,62))*((12,45)-x)+1)))$
Benzoato sódico	mg/L	$y=(35,69)*(\exp(-\exp(((0,078)*2,718282)/(35,69))*((169,83)-x)+1)))$
Sorbato potásico	mg/L	$y=(39,70)*(\exp(-\exp(((0,137)*2,718282)/(39,70))*((79,86)-x)+1)))$
Acido ferúlico	mM	$y=(29,45)*(\exp(-\exp(((3,58)*2,718282)/(29,45))*((1,23)-x)+1)))$
Acido cafeico	mM	$y=(16,49)*(\exp(-\exp(((0,595)*2,718282)/(16,49))*((6,67)-x)+1)))$
Vainillina	mM	$y=(39,98)*(\exp(-\exp(((2,813)*2,718282)/(39,98))*((1,87)-x)+1)))$
Acido cumárico	mM	$y=(14,86)*(\exp(-\exp(((2,20)*2,718282)/(14,86))*((4,95)-x)+1)))$

Entre los conservantes con unidades de mg/L, se deduce claramente que DMDC fue el conservante más eficaz (con valores más elevados de A y μ ; y la más baja λ), con la curva más desplazado hacia la izquierda (figura V.3a).

Por otra parte, como se observa en la figura V.3a, la curva sigmoidea para el sorbato potásico estuvo por encima del benzoato sódico, lo que indica el mayor efecto inhibidor del sorbato potásico. Entre conservantes con unidades de concentración expresadas en mM, la vainillina fue claramente el conservante más eficaz para inhibir parcialmente el crecimiento de *Z. rouxii* (figura V.3b). Entre los ácidos hidroxicinámicos, el ácido ferúlico fue el inhibidor más eficiente, alcanzando el porcentaje máximo de reducción de crecimiento a una dosis más baja en comparación con los otros dos ácidos hidroxicinámicos evaluados. El menor efecto inhibidor se observó para el ácido cafeico,

donde dosis superiores a 40 mM fueron necesarias para lograr la máxima reducción del crecimiento (figura V.3b).

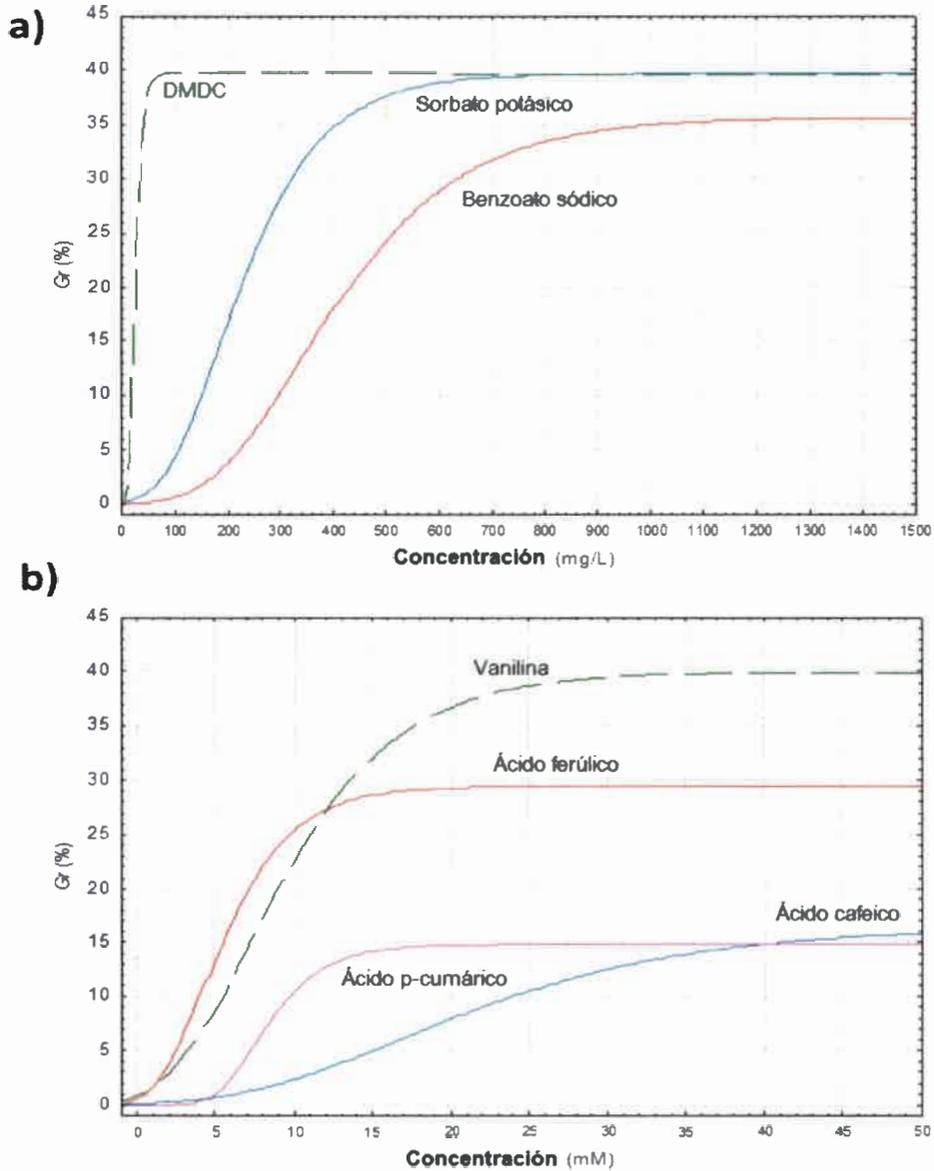


Figura V.3. Expresión gráfica de las ecuaciones matemáticas obtenidas a partir de tres experimentos para la estimación de la reducción de crecimiento en función de la concentración de diferentes conservantes. a) El sorbato potásico, benzoato sódico y DMDC (mg/L) y b) de vainillina, ácidos ferúlico, p-cumárico y cafeico (mM).

Finalmente, la figura V.4 muestra los resultados obtenidos del análisis estadístico (ANOVA) realizado para la máxima reducción del crecimiento para *Z. rouxii*, obtenido para los diferentes conservantes químicos. El ácido p-cumárico y ácido cafeico mostraron el efecto inhibitor más bajo en las máximas dosis evaluadas, sin diferencias significativas entre ellos, con la obtención de sólo un 15 % de reducción del crecimiento de la levadura. El ácido ferúlico presentó aproximadamente un 30 % de reducción, mientras que el benzoato sódico, sorbato potásico, vainillina y DMDC formaron un grupo estadísticamente homogéneo con los porcentajes más altos alcanzados para la reducción del crecimiento de *Z. rouxii* (alrededor del 40 %).

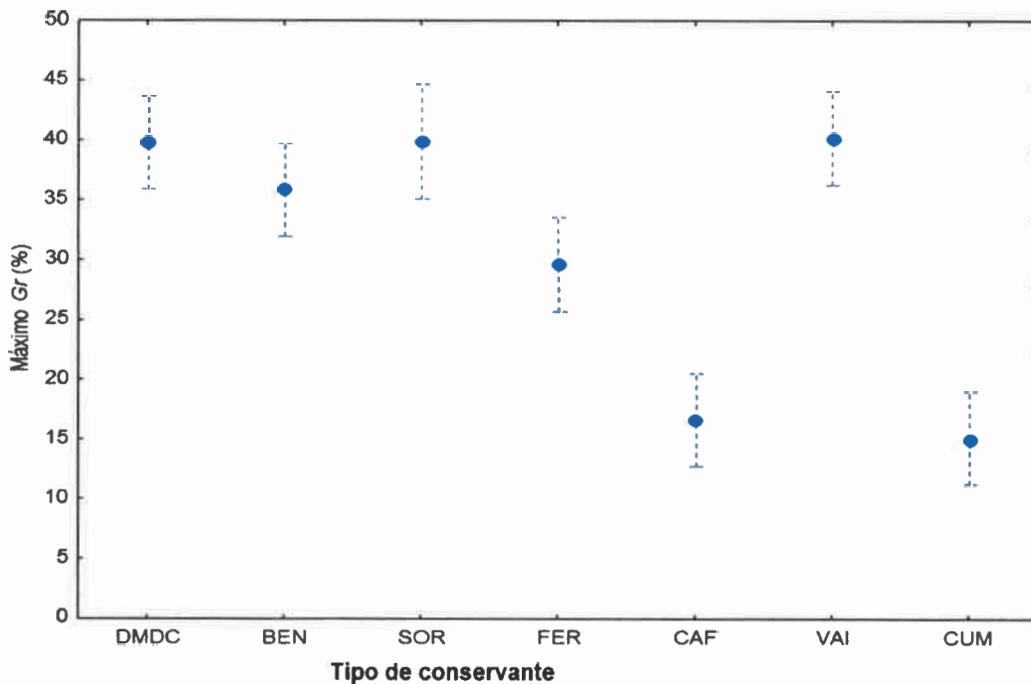


Figura V.4. Análisis de ANOVA y representación gráfica de la reducción del crecimiento máximo (Gr) obtenido para *Z. rouxii* (variable dependiente) en función de los diferentes conservantes (variables categóricas). Los valores medios se obtuvieron a partir de experimentos por triplicado. DMDC, BEN, SOR, FER, CAF, VAI y CUM representan dimetildicarbonato, benzoato sódico, sorbato potásico, ácido ferúlico, ácido cafeico, vainillina y ácido p-cumárico, respectivamente.

Tres de los conservantes evaluados (sorbato potásico, benzoato sódico y DMDC) son compuestos químicos aprobados para ser utilizados en el jugo de uva y en vinos, y en este trabajo se incluyeron las concentraciones máximas permitidas por la Organización Internacional de la Viña y el Vino y el Instituto Nacional de Vitivinicultura (Argentina) para estos productos (OIV, 2013). Los otros cuatro compuestos (vainillina y ácidos hidroxicinámicos, como los ácidos p-cumárico, ferúlico y cafeico) se seleccionaron debido a su carácter natural y porque muestran actividad antimicrobiana en las concentraciones evaluadas lo que ha sido previamente demostrado en diferentes trabajos de investigación (Martorell y col., 2007).

El control de la alteración de los jugos de uva concentrados por levaduras osmófilas depende de las características intrínsecas del sustrato y de las condiciones ambientales durante el procesamiento y almacenamiento que pueden resultar restrictivas o no para el crecimiento de levaduras osmófilas (Rojo y col., 2014).

Como mencionamos en el capítulo III, muchos factores ambientales (por ejemplo, temperatura, pH, a_w , adición de conservantes químicos, composición del sustrato) determinan los límites físicos y químicos para la supervivencia y el crecimiento de las levaduras. Sin embargo, los límites precisos son difíciles de definir, ya que el impacto de un factor puede estar influenciado por otros factores (Fleet, 2011). Los jugos de uva concentrados representan una matriz compleja donde se combinan diferentes variables. Es por ello, que extrapolar resultados sobre el efecto de los distintos conservantes en este sustrato es difícil debido a que sus efectos pueden resultar aditivos o sinérgicos con el resto de las variables ambientales (Praphailong y Fleet, 1997; Vermeulen y col., 2008) y es necesario evaluarlo en medio de cultivo similar al sustrato natural.

Las levaduras rara vez aparecen en los ecosistemas de alimentos y bebidas como cultivos de una sola especie. Las excepciones se producen en aquellos productos muy procesados donde se conoce que la alteración está dada por especies individuales y bien adaptadas, como *Z. rouxii* en los productos con alto contenido de azúcar (Stratford, 2006). Por otra parte, es conocido que el nivel de resistencia a los conservantes químicos depende de la cepa y del estado fisiológico de las células (Martorell y col., 2007).

Nuestros resultados mostraron que el quitosano no presentó ninguna actividad antimicrobiana frente al cóctel de cepas de *Z. rouxii* evaluado en un medio de cultivo con alta concentración de azúcar. Incluso en la dosis más alta ensayada en este trabajo (300 mg/L), que excede el nivel máximo permitido en vinos (100 mg/L), no se observó inhibición del crecimiento.

Los conservantes como los ácidos orgánicos tales como ácidos sórbico y benzoico se añaden habitualmente en una amplia gama de alimentos y bebidas para controlar el crecimiento de levaduras. La eficacia de estos agentes conservadores depende de su concentración y de las propiedades de los alimentos, tales como la concentración de azúcar y el pH (Fleet, 2011). La acción antimicrobiana de los ácidos débiles es dependiente del pH, y se ha establecido que son mucho más activos en ambientes ácidos. El pH bajo favorece la forma no disociada del ácido débil, que es permeable a la membrana celular, y en consecuencia, más tóxico para la célula (Martorell y col., 2007). La hipótesis de que las moléculas de ácido no disociado pasan al interior de la célula e inhiben el crecimiento de la levadura a través de la acidificación del citoplasma ya ha sido demostrada (Krebs y col., 1983; Stratford y col., 2013). El ácido sórbico tiene un pKa superior (pKa = 4,76) que el ácido benzoico (pKa = 4,20) y como consecuencia, la fracción no disociada del ácido sórbico está siempre por encima de la del ácido benzoico. En el medio de cultivo utilizado en nuestro ensayo, las formas no disociadas del ácido sórbico y ácido benzoico fueron 65 y 43% respectivamente. La máxima reducción del crecimiento alcanzada con estos compuestos fue estadísticamente similar (36-40%), pero una dosis más baja de sorbato potásico fue necesaria para alcanzar el mismo porcentaje de inhibición. En consecuencia, el sorbato potásico sería un inhibidor de levaduras osmófilas más eficaz para utilizar en jugos de uva concentrados que el benzoato sódico.

Varios mecanismos de resistencia a los ácidos débiles se han descrito en *Z. rouxii* y otras especies de levaduras relacionadas como *Z. bailii* y *S. cerevisiae* (Piper, 2011; Stratford y col., 2013). En general, los mecanismos de resistencia que se sugieren son: i) la degradación y el metabolismo del conservante y ii) la presencia de una bomba de salida lo que permite sacar los conservantes fuera de la célula (Warth, 1977 y 1988; Stratford y col., 2007; Piper, 2011). Recientemente, Stratford y col. (2013) propusieron

que la extrema resistencia a los ácidos débiles en *Z. bailii* se debe a la heterogeneidad de la población, donde una pequeña proporción de células presenta un pH intracelular más bajo. Esto reduce el nivel de acumulación de cualquier ácido débil en el citoplasma, lo que confiere resistencia a todos los ácidos débiles, pero no a otros inhibidores. En nuestro trabajo, no se logró una inhibición completa del cóctel de *Z. rouxii* por el ácido sórbico y el ácido benzoico, principalmente debido a que la susceptibilidad a estos agentes químicos es variable en distintas cepas de la misma especie de levadura, donde algunas cepas son más resistentes que otras (Fleet, 2011).

El DMDC se utiliza como agente antimicrobiano para la esterilización de bebidas fermentadas. Este compuesto actúa mediante la inhibición de algunas enzimas glucolíticas particularmente la alcohol deshidrogenasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por metoxicarbonilación de los residuos nucleófilos (imidazoles, aminas, tioles). Además su efecto no es dependiente del pH (Renouf y col., 2008). La eficacia del DMDC para inhibir varias especies de levaduras relacionadas con el jugo de uva y el vino ya ha sido demostrada (Delfini y col., 2002; Renouf y col., 2008; Siricururata y col., 2013). En medio sintético, la actividad inhibitoria del DMDC fue dependiente de las especies de levaduras donde 400 mg/L de DMDC fueron necesarios para lograr la inhibición completa de *Z. bailii* (Delfini y col., 2002). Por otra parte, diferentes cepas de *Z. bailii* aisladas de jarabes, confitados y turrón de frutas resultaron ser altamente resistentes a DMDC. La concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida para cepas de *Z. rouxii* aisladas a partir de jarabes alterados evaluada en el medio de cultivo YPD (pH 4,0) fue de 230 mg/L (Martorell y col., 2007). Por el contrario, Costa y col. (2008) encontraron que la CIM de DMDC para *Z. bailii* aislada de vinos contaminados fue tan baja como 25 mg/L. Los resultados más prometedores se obtuvieron con un tratamiento de combinación con DMDC (250 mg/L) y natamicina (10 mg/L) en jugos de uva inoculados con un cóctel de distintas especies de levaduras como *Dekkera*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*, observándose que la extensión de la vida útil del producto fue similar a la del control positivo (0,05 % benzoato de sodio y sorbato de potasio) (Siricururata y col., 2013). En nuestro trabajo, el DMDC no fue capaz de inhibir completamente el crecimiento del cóctel de *Z. rouxii* en un medio con elevada concentración de azúcar y bajo pH, incluso en dosis más altas que las aceptadas. La máxima reducción del crecimiento obtenida con DMDC fue similar a

la obtenida en los ensayos con ácido sórbico y ácido benzoico. Por otro lado, Daudt y Ough (1980) establecieron una correlación semilogarítmica entre la población de levaduras viables iniciales y la concentración de DMDC necesario para inhibirlas. Cuando las células viables iniciales aumentaban 10 veces, se requería una cantidad adicional de aproximadamente 5 mg/L de DMDC. En contraste, en nuestro trabajo, la máxima reducción del crecimiento se logró en las dosis mínimas de DMDC ensayadas, y el aumento de las concentraciones no produjo un mayor aumento del efecto inhibitor. La velocidad de hidrólisis de DMDC en diversas condiciones ha sido estudiada y la vida media en la reacción con el agua es de aproximadamente 8 minutos a 30°C, siendo completamente hidrolizado en menos de 1 hora (Genth, 1979; Ough, 1983). Por lo tanto, se espera que el máximo efecto antimicrobiano del DMDC ocurra cuando la concentración es mayor y poco tiempo después de su adición antes de que comience la degradación. Por esta razón, el DMDC no debe ser utilizado como agente de prevención ya que su acción no perdura en el tiempo, pero si puede aplicarse como agente para reducir las poblaciones de levaduras no deseadas presentes en el jugo de uva.

La vainillina se utiliza actualmente como un agente aromatizante y también es un aditivo prometedor para inhibir las levaduras en algunos productos de frutas. Las concentraciones añadidas a los productos alimenticios tales como helados y dulces son aproximadamente 20 y 26 mM respectivamente (Hocking, 1997). Estudios anteriores han demostrado que ciertas levaduras son capaces de convertir la vainillina a sus respectivos derivados de alcohol y de ácido (Edlin y col., 1995). Sin embargo, no se ha establecido si tal proceso de bioconversión podría afectar negativamente a la actividad antimicrobiana de la vainillina (Fitzgerald y col., 2003). Cerrutti y Alzamora (1996) mostraron que el crecimiento de *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *Z. bailii* y *Debaryomyces hansenii* se inhibió en medios de cultivo y manzana que contenía 13 mM de vainillina. Además, la vainillina inhibió a *Z. rouxii* y otras levaduras en concentraciones de 20 mM, pero las concentraciones más bajas también fueron eficaces cuando se combinaron con otras condiciones más restrictivas tales como temperaturas más bajas y pH bajo (Fitzgerald y col., 2003). Por otra parte, Matamoros-León y col. (1999) han demostrado que las concentraciones inhibitoras de vainillina variaron de 7,3 a 8,6 mM para controlar diferentes especies de *Penicillium* en medios de cultivo. Los efectos sinérgicos sobre la inhibición de este hongo cuando se añadieron vainillina y sorbato de potasio en

combinación, también se han demostrado. En nuestro trabajo, se evaluó una amplia gama de concentraciones de vainillina (2 a 30 mM) en medio MYGF alcanzando sólo el 40 % de la reducción del crecimiento de *Z. rouxii* para la concentración máxima de vainillina evaluada. Las condiciones del medios de cultivo (390 g/L de glucosa + fructosa y pH 4,5) representan las condiciones más favorables para el desarrollo *Z. rouxii* debido al carácter osmófilico de esta especie de levadura y estos podrían estar actuando como protectores impidiendo que el conservante ejerza su efecto.

Los ácidos hidroxicinámicos (AHC) y sus derivados están presentes en plantas y frutos, lo que les proporciona una protección natural contra la infección por microorganismos patógenos (Chambel y col., 1999). El uso de compuestos activos antimicrobianos de origen natural en las uvas (por ejemplo, AHC y otros fenoles) ofrece posibilidades para un nuevo enfoque en la conservación de jugos y vinos. Debido a la capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias alterantes de alimentos, así como su carácter natural, estos compuestos son cada vez más estudiados por su potencial de uso polivalente en las técnicas de conservación de alimentos (Rodríguez Vaquero y col., 2007). El mecanismo de acción de los ácidos cinámicos se basa en la desestabilización de la membrana lo que genera un cambio bioenergético que puede contribuir a su acción antimicrobiana (Mirzoeva y col., 1997). Se cree que estos compuestos pueden conducir a la estimulación del flujo pasivo de protones a través de la membrana plasmática provocando un aumento en su permeabilidad y consiguientemente una estimulación de la actividad de la bomba ATPasa de la membrana plasmática (SA- Correia y col., 1989). Chambel y col. (1999) informaron que las células de *S. cerevisiae* cultivadas a pH 4, en presencia de concentraciones de 20 y 30 mg/L de los ácidos cinámicos y mostraron una mayor actividad de la bomba ATPasa de la membrana plasmática que en las células control. En un estudio previo se mostró que la sensibilidad a los AHC es dependiente del organismo evaluado (Campos y col., 2003). Por otra parte, otros autores han propuesto que la actividad de los AHCs es fungistática y no fungicida contra *Dekkera spp* y que las propiedades antimicrobianas de los fenoles de uva dependen en gran medida de las diferencias en sus estructuras químicas (Harris y col., 2010). Los resultados presentados aquí muestran que el ácido ferúlico fue el AHC más eficaz en la prevención del crecimiento de *Z. rouxii* en un medio con alta concentración de azúcar y condiciones de pH bajo. Este hallazgo coincide con los resultados informados por

Harris y col. (2010) quienes encontraron que la concentración inhibitoria mínima (CIM) para *D. bruxellensis* y *D. anomala* en medios de cultivo fue de 4 y 8 mM para el ácido ferúlico, y 8 y 10 mM para el ácido p-cumárico, respectivamente. Recientemente, Pastorkova y col. (2013) demostraron que los ácidos p-cumárico y ferúlico mostraron efectos inhibidores selectivos sobre *Z. rouxii* con concentraciones superiores o iguales a 1,55 y 1,30 mM de ácido p-cumárico y ácido ferúlico, respectivamente. En contraste, el ácido cafeico no mostró ninguna actividad inhibitoria contra levaduras ni bacterias. En nuestro trabajo, la máxima reducción del crecimiento alcanzada por adición de AHC fue aproximadamente del 15 a 30%.

V. 5. Conclusiones de este capítulo

- ✓ Ningún compuesto químico evaluado fue capaz de reducir completamente el desarrollo de *Z. rouxii* en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de esta levadura.
- ✓ El quitosano no produjo inhibición de crecimiento de *Z. rouxii* incluso en las máximas concentraciones evaluadas (300 mg/L).
- ✓ La máxima reducción del crecimiento (40%) de *Z. rouxii* se obtuvo con DMDC, benzoato sódico, sorbato potásico y vainillina.
- ✓ Las ecuaciones matemáticas obtenidas permiten predecir el porcentaje de reducción del crecimiento de *Z. rouxii* en un medio con elevada concentración de azúcar en función del conservante químico utilizado y puede ser de utilidad para la industria de jugo de uva concentrado.

Capítulo VI

Capítulo VI: “Evaluación de la incidencia de levaduras osmófilas en diferentes plantas concentradoras de jugo de uva de las provincias de Mendoza y San Juan”

VI.1. Hipótesis

- ✓ Existe una elevada población de levaduras osmófilas en las plantas concentradoras de jugo de uva.
- ✓ Durante la elaboración del jugo de uva concentrado existen puntos críticos donde la contaminación con levaduras osmófilas puede ocurrir.

VI.2. Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la incidencia de levaduras osmófilas en jugos de uva antes y después del concentrado y sobre distintas superficies de las plantas concentradoras.
- ✓ Identificar los puntos de contaminación con levaduras osmófilas durante la elaboración del jugo de uva concentrado que permitan tomar las medidas correctivas y preventivas correspondientes.

VI.3. Materiales y Métodos

VI.3.1. Evaluación de la incidencia de levaduras osmófilas en tres plantas concentradoras ubicadas en las provincias de Mendoza y San Juan.

Para el presente estudio se eligieron tres plantas concentradoras de jugo de uva ubicadas en las provincias de Mendoza y San Juan. Las mismas fueron elegidas porque presentan diferentes protocolos de elaboración y equipamiento, y diferentes escalas de producción. La planta concentradora A, está ubicada en Junín, provincia de Mendoza y produce 3.500 toneladas anuales; la planta B pertenece a la provincia de San Juan y produce 10.000 toneladas por año y por último, la planta concentradora C, se ubica en el departamento de Rivadavia, provincia de Mendoza con una producción anual de aproximadamente 25.000 toneladas.

El procesamiento del jugo de uva para concentrar presenta varias etapas descriptas detalladamente en la introducción, las cuales incluyen a grandes rasgos, la obtención del jugo de uva por descobajado y molienda, sulfitado, filtración, desulfitado, pre-concentración, concentración, pasteurización y envasado (Bollea y col., 2008). Durante la elaboración del jugo de uva concentrado se tomaron muestras para evaluar la presencia de levaduras osmófilas. Estos puntos de muestreo se determinaron “*in situ*” dependiendo de la planta elaboradora, los cuales incluyeron muestras de jugo de uva sulfitado, jugo desulfitado, jugo de uva pre-concentrado, jugo de uva concentrado, y muestras de superficies de mangueras, tanques, piso y paredes, entre las más importantes, de cada planta elaboradora (tablas VI.1 y VI.2). Es importante destacar que las muestras tomadas incluyeron el seguimiento de un mismo jugo de uva desde su ingreso a la planta como jugo de uva sulfitado hasta su egreso de la planta como jugo de uva concentrado envasado. Por lo tanto, las muestras fueron tomadas en sucesivas visitas a las plantas concentradoras de acuerdo a los tiempos y etapas en las cuales se completa el proceso para cada empresa.

Las muestras obtenidas de los jugos antes y después de concentrar, fueron sembradas mediante siembra en superficie en el medio selectivo para levaduras osmófilas MY50G, previa dilución en solución de glucosa al 30% cuando fue necesario (Combina y col., 2008). Las placas de Petri se incubaron a 28°C hasta observar desarrollo visible de

colonias. Simultáneamente se realizó una filtración de las muestras; para ello se pesaron 50 gramos de muestra y se diluyeron a la mitad con agua glucosada al 30%. El volumen total de muestra se filtró a través de una membrana de 0,45 μm colocada sobre un portafiltros estéril. Se tomó la membrana en condiciones de esterilidad y se colocó en el medio de cultivo MY50G (Combina y col., 2008). Se incubó a 28 °C durante 5-7 días.

Tabla VI.1. Muestras tomadas en las distintas etapas de la elaboración de jugo de uva concentrado en distintas plantas concentradoras de Mendoza y San Juan.

Muestras	Planta A	Planta B	Planta C
Jugo SO ₂	X	X	X
Jugo SO ₂ acidificado		X	X
Jugo de uva desulfitado	X	X	
Jugo pre-concentrado	X		X
JPC estabilizado tartáricamente	X		X
JPC filtrado	X		X
H ₂ O de lavado de filtros	X	X	
JUC	X	X	X

Jugo SO₂: Jugo de uva sulfitado, JPC: jugo pre-concentrado, JUC: Jugo de uva concentrado.

Las muestras de las superficies fueron tomadas con hisopos estériles y colocados en tubos que contenían 10 mL de una solución estéril de agua glucosada al 30 %. Con ellos se realizó un hisopado diseminando con el hisopo la superficie del medio de cultivo para levaduras osmófilas MY50G (Combina y col., 2008) repetidas veces. Por otro lado y en simultáneo, se realizó una filtración de los 10 mL de la solución que contenía el hisopo; para ello se colocó con una pinza estéril, una membrana de 0,45 μm sobre el portafiltros. Se filtró el contenido total de la solución glucosada, y una vez concluida la filtración se tomó la membrana con esterilidad y se colocó en el medio de cultivo

MY50G (Combina y col., 2008). Las placas se incubaron a 28°C hasta observar desarrollo visible de colonias.

Tabla VI.2. Hisopados de superficies de distintas plantas concentradoras de jugos de uva.

Superficies	Planta A	Planta B	Planta C
Tanque de ingreso Jugo SO ₂		X	X
Tanque que recibe Jugo SO ₂ acidificado			X
Tanque que recibe JPC	X		X
Tanque que recibe JUC	X	X	X
Pisos	X	X	X
Paredes	X	X	X
Mangueras	X	X	
Caño llenadora	X	X	
Pico llenadora (sala de envasado)			X
Guantes de los operarios			X

Jugo SO₂: Jugo de uva sulfitado, JPC: Jugo pre-concentrado; JUC: Jugo de uva concentrado

VI.4. Resultados y Discusión

VI.4.1. Determinación de la incidencia de levaduras osmófilas en tres plantas concentradoras correspondientes a las provincias de Mendoza y San Juan.

Se tomaron muestras de distintas etapas del proceso de obtención de jugo de uva concentrado y se obtuvieron distintos recuentos de levaduras osmófilas. En la tabla VI.3 se muestran los recuentos de levaduras osmófilas obtenidos en las distintas muestras de jugo de uva y en la tabla VI.4 se muestran los obtenidos en las distintas superficies de las plantas concentradoras visitadas.

Tabla VI.3. Recuentos de levaduras osmófilas en distintas muestras durante la concentración de jugo de uva en diferentes empresas.

Muestras	Planta A (ufc/50g)	Planta B (ufc/50g)	Planta C (ufc/50g)
Jugo de uva SO ₂	<1	<1	<1
Jugo de uva SO ₂ acidificado		<1	<1
Jugo de uva desulfitado	<1	<1	
Jugo de uva pre-concentrado	>4.10 ⁴		>4.10 ⁴
JPC destartarizado	>4.10 ⁴		>4.10 ⁴
JPC filtrado	>4.10 ⁴		>4.10 ⁴
H ₂ O de lavado de filtros	>4.10 ⁴	>4.10 ⁴	
Jugo de uva concentrado	<1	>4.10 ⁴	
JUC pasteurizado		15	<1

Jugo SO₂: jugo de uva sulfitado, JPC: Jugo de uva pre-concentrado, JUC: jugo de uva concentrado

Tabla VI.4. Recuentos de levaduras osmófilas obtenidas de hisopados de distintas superficies durante el procesamiento de jugo de uva en diferentes empresas

Superficies	Planta A (ufc/400cm²)	Planta B (ufc/400cm²)	Planta C (ufc/400cm²)
Tanque de ingreso Jugo SO ₂		<1	<1
Tanque Jugo SO ₂ acidificado			<1
Tanque que recibe JPC	1		
Tanque que recibe JUC	<1	1	
Pisos	<1	>4.10 ⁴	>4.10 ⁴
Paredes	<1	5	<1
Mangueras	<1	518	
Caño llenadora	>4.10 ⁴	<1	<1
Guantes de los operarios			<1

Jugo SO₂: Jugo de uva sulfitado, JPC: Jugo pre-concentrado, JUC: Jugo de uva concentrado.

Los resultados obtenidos en las muestras de jugo de uva antes y después de concentrar y en las diferentes superficies evidencian que las levaduras osmófilas no fueron detectadas en etapas previas al pre-concentrado o concentrado del jugo de uva. Los recuentos menores a 1 ufc en 50 gramos fueron obtenidos en muestras de jugo de uva sulfitado, en los jugos luego de la acidificación mediante columnas de intercambio iónico y en los jugos de uva luego del proceso de desulfitado (tabla VI.3).

Se observó presencia de levaduras osmófilas en los jugos de uva pre-concentrados, en los jugos después de la estabilización tartárica y filtrado del mismo, en recuentos elevados (mayor a 10^4) en las dos plantas procesadoras (A y C) que realizan el pre-concentrado de los jugos antes de su concentración final (tabla VI.3.). Con respecto a los jugos concentrados el recuento final de levaduras osmófilas dependió de la planta productora. En las plantas concentradoras A y C, no se detectaron levaduras osmófilas mientras que en la planta B el recuento en el producto final fue de 15 ufc/50 g (tabla VI.3). Los resultados obtenidos en las plantas A y C, permiten observar que a pesar de que el jugo pre-concentrado almacenado en los tanques pulmón presenta un elevado recuento de levaduras osmófilas antes de entrar al concentrador, el proceso mismo de concentración, el cual incluye elevadas temperaturas, disminuye drásticamente las poblaciones, produciendo recuentos menores a 1 ufc en 50 gramos del producto final. En estas dos plantas, la línea de envasado está directamente vinculada con el concentrador; en la planta A se fracciona directamente a medida que se va concentrando, mientras que en la planta C, el jugo de uva concentrado entra en un sistema cerrado e inertizado donde se mantiene hasta su fraccionamiento. Las condiciones que se dan en estas dos plantas sugieren que el producto final es envasado con una baja carga microbiana. Por otro lado, la planta B, presenta un proceso de producción diferente donde el jugo de uva sulfitado es directamente concentrado en una sola etapa, homogeneizado y almacenado en tanques pulmón hasta su fraccionamiento, el cual incluye un proceso de pasteurización previo al envasado. En esta planta, el jugo de uva concentrado que, por lo observado anteriormente, saldría del concentrador sin presencia de levaduras osmófilas, se re-contaminaría durante su almacenamiento en el tanque pulmón. En la tabla VI.3 se observa que el recuento obtenido para el jugo de uva concentrado antes de ser pasteurizado fue mayor a 10^4 ufc en 50 gramos, y luego de la pasteurización aun mantuvo un recuento de 15 ufc/50 g. De acuerdo a nuestros

resultados obtenidos sobre los programas de pasteurización que deberían aplicarse a este producto para alcanzar la esterilidad industrial, esta observación podría sugerir que el programa de pasteurización aplicado (94°C con un tiempo de retención de 62 segundos) habría sido suficiente para alcanzar la esterilidad industrial ya que se trata de un programa que aplica temperaturas superiores a las recomendadas en nuestro estudio previo. El recuento observado en el producto final podría entonces deberse a una re-contaminación producida en etapas posteriores por el contacto con cañerías antes de su envasado final, como ha sido observado en etapas anteriores en esta misma planta.

El hisopado de las diferentes superficies de las plantas elaboradoras durante el completo procesamiento de los jugos de uva concentrados mostró nuevamente presencia de levaduras osmófilas solo en las superficies relacionadas con el jugo pre-concentrado y concentrado, y no en las superficies asociadas a etapas previas a la concentración (tabla VI.4). En las plantas A y C donde el jugo de uva se pre-concentra y se almacena en tanques antes de su concentración final, se observaron recuentos positivos para levaduras osmófilas en las superficies de los tanques donde el jugo pre-concentrado fue almacenado (tabla VI.4). De hecho, esta superficie constituiría una fuente de contaminación de los jugos pre-concentrados que evidenciaron una elevada carga microbiana (tabla VI.3). Por otro lado, la planta A no mostró recuentos de levaduras osmófilas en paredes, pisos y en el tanque que recibe el jugo de uva concentrado a la salida del concentrador, evidenciando una buena práctica de higiene. Sin embargo, el caño de la maquina llenadora presentó un elevado recuento y puede constituir una fuente de re-contaminación del producto ya envasado (tabla VI.4). La planta C mostró un elevado recuento de levaduras osmófilas en los pisos constituyendo éste la principal fuente de contaminación (tabla VI.4). En la planta B, donde el jugo de uva es directamente concentrado, se observó una situación distinta a las otras dos plantas, evidenciando presencia de levaduras osmófilas en todas las superficies asociadas al jugo de uva concentrado siendo mayor en los pisos y mangueras que por su porosidad y difícil acceso para la limpieza podrían representar el reservorio de levaduras contaminantes (tabla VI.4).

Otra evidencia que avala que las superficies pueden constituir una fuente de contaminación con levaduras osmófilas, fue lo observado en la planta C durante las

etapas de filtrado de jugo de uva pre-concentrado. En la tabla VI.5 se muestran los recuentos obtenidos en las distintas etapas de filtrado. En esta planta se realizan tres etapas de filtrado del jugo pre-concentrado (filtrado grueso, filtrado fino, filtrado placa) donde el jugo es almacenado en piletas o tanques entre cada etapa de filtración. El periodo de permanencia en estas piletas o tanques puede ser de un día a una semana dependiendo de la capacidad de la planta y la demanda de jugos concentrados. Los resultados muestran que el filtrado fino y el filtrado por placas redujo gran parte de la población osmófila pero la misma aumentó nuevamente durante el almacenamiento del jugo de uva pre-concentrado en los tanques o piletas, sugiriendo que estas superficies podrían actuar como punto de contaminación aportando levaduras osmófilas. La retención de levaduras osmófilas por las placas filtrantes también se puede evidenciar en los elevados recuentos obtenidos en el agua de lavado de los filtros mostrado en la tabla VI.3 para las plantas A y B.

Tabla VI.5. Recuentos de levaduras osmófilas de distintas muestras de jugos de uva pre-concentrado de la planta C.

Muestras	Planta C (ufc/50 g)
JPC	$>4.10^4$
JPC destartarizado	$>4.10^4$
JPC después del filtrado grueso	$>4.10^4$
JPC antes del filtrado fino	$>4.10^4$
JPC después del filtrado fino	< 1
JPC entrada al filtro placa	$>4.10^4$
JPC salida al filtro placa	< 1
JPC almacenado antes de concentrar	$>4.10^4$

JPC: Jugo de uva pre-concentrado

No existen referencias previas sobre la distribución de levaduras osmófilas contaminantes de plantas elaboradoras de jugo de uva concentrado, pero estudios realizados por Mercado y col., (2007) sobre la distribución de *Saccharomyces cerevisiae* en superficies de bodegas podría avalar lo encontrado en nuestro estudio.

Estos autores evaluaron la presencia de cepas de *Saccharomyces* asociadas con el equipamiento de la bodega, la uva y las fermentaciones espontáneas de mostos variedad Malbec durante dos vendimias consecutivas (2001 y 2002) en una misma bodega. Los autores concluyen que entre 30 y 60% de la población de levaduras al final de la fermentación coincidió con cepas de levaduras aisladas previamente en las superficies de la planta. Por otro lado, los autores confirman que estas cepas de *Saccharomyces* permanecen en la bodega conformando una población residente en la bodega que contamina los mostos año a año. Estos resultados coinciden con lo encontrado en nuestro trabajo que demuestra que la levadura *Z. rouxii* que contamina los jugos de uva concentrados no proviene de la uva, ya que las sucesivas filtraciones y las temperaturas elevadas a las que son sometidos los jugos de uvas durante el proceso de concentración las eliminaría por completo. Por otro lado, sugiere que las levaduras osmófilas estarían presentes en las diferentes superficies de las plantas concentradoras de jugo de uva, por lo que la contaminación con estas levaduras se produciría en etapas posteriores a la concentración y estaría directamente relacionada a las superficies con las que entra en contacto el jugo de uva concentrado, y por supuesto, con la higiene de la planta. En concordancia con nuestros resultados, Martorell y col. (2005) en un estudio sobre la presencia de levaduras alteradoras durante la elaboración de frutas abrillantadas y turrónes, demostraron que solo dos cepas de *Z. rouxii* eran las responsables de la alteración de todos los lotes de frutas abrillantadas. Estos autores logran encontrar el punto de contaminación con estas levaduras, demostrando que los jarabes continuamente reutilizados para la elaboración de las frutas abrillantadas constituían el reservorio de estas cepas y eran el origen de la contaminación que también aparecía en distintas etapas de la elaboración de turrónes con frutas abrillantadas y en los productos almacenados.

VI.5. Conclusiones de este capítulo

- ✓ Se observa ausencia de levaduras osmófilas en muestras de jugo de uva en etapas previas al proceso de pre-concentrado y concentrado.
- ✓ Se observa presencia de levaduras osmófilas en jugos de uva pre-concentrados y en etapas posteriores, incluso en jugo de uva concentrado pasteurizado.
- ✓ Se confirma la presencia de levaduras osmófilas en distintas superficies de la planta elaboradora asociadas a las etapas de pre-concentrado y concentrado de jugo de uva.
- ✓ Las superficies de equipamientos del establecimiento asociadas a la concentración de los jugos de uvas constituyen un reservorio de levaduras osmófilas y pueden constituir un punto de re-contaminación del producto ya elaborado.

Capítulo VII: Conclusión y Proyecciones

VII.1 Conclusión final

En una primera etapa se seleccionó la cepa MC9 que presentó mayor potencial alterador (mayor velocidad de crecimiento y menor fase lag) para ser utilizada en los ensayos de vida útil. En estos ensayos los resultados mostraron que la disminución del pH produjo el mayor efecto para retardar el desarrollo de esta levadura y que un pH cercano a 2 aumentó la estabilidad microbiana del jugo de uva concentrado a más de 60 días. Se desarrolló un modelo predictivo que es de gran utilidad para la industria para estimar el crecimiento de la levadura en diferentes valores de concentración de azúcar y pH a temperaturas de almacenamiento y transporte. Se seleccionó la cepa de *Z. rouxii* más termo-resistente (MC8) y se propusieron diferentes programas de pasteurización para alcanzar la esterilidad industrial de los jugos de uvas concentrados. Ninguno de los conservantes químicos ensayados fue capaz de inhibir completamente el desarrollo de *Z. rouxii* en un medio con elevado contenido de azúcar, aunque algunos de ellos lograron una reducción del crecimiento del 40%. En las plantas elaboradoras de jugo de uva concentrado, se observó ausencia de levaduras osmófilas en muestras de jugo de uva en etapas previas al proceso de pre-concentrado y concentrado, pero si en etapas posteriores, incluso en jugo de uva concentrado pasteurizado. Se confirmó la presencia de levaduras osmófilas en distintas superficies de la planta elaboradora, que podrían representar puntos de contaminación del producto en las diferentes etapas de su elaboración.

VII.2 Proyecciones

Los resultados obtenidos en la presente tesis han contribuido a aumentar la estabilidad microbiológica del jugo de uva concentrado mediante el ajuste de parámetros físicos y químicos propios del sustrato, la aplicación de tratamientos térmicos y adición de conservantes. Resulta estratégico completar los estudios sobre el origen de la contaminación con microorganismos alteradores durante la elaboración de los jugos de uva concentrados, y evaluar tecnologías emergentes que puedan ser aplicadas para la reducción de las levaduras osmófilas contaminantes en este sustrato, con perspectivas a diseñar un adecuado programa de calidad para esta industria.

Las proyecciones del presente trabajo son:

- 1) Completar los estudios de la incidencia de levaduras osmófilas durante la elaboración del jugo de uva concentrado e identificar los puntos de contaminación en las plantas elaboradoras. Para ello se proponen los siguientes objetivos:
 - 1.1) Identificar las especies de levaduras osmófilas presentes en jugos de uva durante las diferentes etapas del concentrado y en las distintas superficies con las que entra en contacto el producto durante su elaboración.
 - 1.2) Diferenciar las cepas de *Z. rouxii* que contaminan los jugos durante su procesamiento e identificar el origen de la contaminación en las plantas concentradoras.
 - 1.3) Desarrollar una metodología rápida para la identificación y cuantificación de *Z. rouxii* en jugo de uva concentrado basada en PCR real time de células viables (v-qPCR)
- 2) Completar los estudios para la reducción de las poblaciones de *Z. rouxii* en jugos de uva concentrados mediante la evaluación de tecnologías emergentes. Para ello se proponen los siguientes objetivos:
 - 2.1) Controlar y reducir la población de *Z. rouxii* mediante la aplicación de altas presiones hidrostáticas (pasteurización fría).
 - 2.2) Validar los tratamientos de pasteurización (caliente y fría) en escala industrial.



Capítulo VIII: Bibliografía

VIII. Bibliografía

Ablin, A. (2012). “El Mercado del Jugo de Uva Concentrado”. Área de Industria Alimentaria - Dirección de Promoción de la Calidad de Productos Agrícolas y Forestales - Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Mendoza, Argentina. Pp: 1-10

Alzamora, S.M., Cerrutti, P., Guerrero, S. y López-Malo, A. (1995). “Minimally processed fruits by combined methods”. In: G.V. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes (Eds) Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications. ISOPOW PRACTICUM II. Eds. Technomic Publication. Pennsylvania, USA. Pp: 463-492

Alzamora, S.M. (1997). “Preservación I. Alimentos conservados por factores combinados”. En Temas de Tecnología de Alimentos. Ed. J.M. Aguilera. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. Pp: 45-88.

Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., López-Malo, A., Palou, E., Char, C.D., y Raffellini, S. (2010). “Models for microorganism inactivation: application in food preservation design”. Effects on Safety and Quality of Foods. Pp: 87-115. Ed. E. Ortega-Rivas, CRC Press.

Arroyo-López, F.N., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A. (2006). Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, a yeast related to table olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 45-51.

Arroyo- López, F.N., Bautista-Gallego, M.C., Durán- Quintana, A. y Garrido-Fernández, A. (2008). “Modelling the inhibition of sorbic acid and sorbic benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives”. *Food Microbiol.* 25, 566-574.

Astiasarán, I. y Martínez, J. (2000). “Alimentos: composición y propiedades”. Ed. Mc. Graw-Hill.

- Ball, C. O. y Olson, F.C.W. (1957). "Sterilization in food technology". McGraw-Hill Book Company, New York.
- Baranyi J. y Le Marc Y. (2008). "DMfit Dinamyc modelling fit program". Institute of Food Research. Version 2.1.
- Barnett, J.A., Payne, R. W. y Yarrow, D. (1983) (Eds). "Yeast characteristics and identification". Cambridge University Press, Cambridge.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. y Yarrow, D. (2000). "Yeasts: Characteristics and Identification". Cambridge University Press, Cambridge.
- Bathey, A.S., Duffy, S. y Schaffner, D.W. (2002)." Modeling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailli*, and *Candida lipolytica*". *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1901-1906.
- Bean, P. G. (1983). "Developments in heat treatment processes for shelf-stable products". In T. A. Roberts and F. A. Skinner (ed.), *Food microbiol: advances and prospects*. Academic Press, Inc., New York.
- Bessey, E.A. (1950) (Ed.)."Morphology and taxonomy of fungi". McGraw-Hill Book Company, New York.
- Beuchat, L.R. (1982). "Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose". *J. Food Sci.* 47, 1679–1682.
- Berry, J. M., Witter, L. D.y Folinazzo, J. F. (1956)."Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice and concentrate. *Food Technol.* 10,553-556.
- Bollea, C.,Fernandez, H., Hechegaray, C.y Azcurra, S. (2008) "Mosto concentrado" Industrias y servicios. Pp. 1-23
- Booth, I.R y Kroll, R.G. (1989). "The preservation of foods by low pH". In: G.W. Gould (Ed.) *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science, Londres, Inglaterra. Pp: 119

- Brewer, M. S. (1999). "Traditional preservatives-sodium chloride". In R. K. Robinson, C. A. Blatt and P. D. Patel (Eds) *Encyclopedia of food microbiology*, vol. 3. London: Academic. Pp: 1723–1728.
- Brown, A. D. (1978). Compatible solute and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 17,181–242.
- Brown, M. H., y O. Emberger. (1980). "Oxidation-reduction potential". In J. H. Silliker (Ed.), *Microbial ecology of foods*, Vol. I, Capítulo. 6. Academic Press, Inc., New York.
- Brown, A. D. (1990). "Microbial water stress physiology: principles and perspectives". J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
- Brown, M.H. y Bootd, I.R. (1991). "Acidulants and low pH". In: N.J. Russel y G.W. Gould (Eds) *Food Preservatives*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. Pp: 22.
- Bruzone, A. (1998). "Cadenas alimentarias: Jugo de uva concentrado". *Alimentos Argentinos* 8, 42-45.
- Buenas Prácticas de Manufactura. Reglamento técnico sobre las condiciones higiénico sanitarias. República Argentina, (1997).
- Campos, F.M., Couto, J.A. y Hogg, T.A. (2003). "Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*". *J. Appl. Microbiol.* 94, 167-174.
- Cerf, O. (1977). "Tailing of survival curves of bacterial spores, a review". *J. Appl. Bacteriol.* 42, 1-19.
- Cerrutti, P. y Alzamora, S.M. (1996). "Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruiy purées". *Int. J. Food Microbiol.* 29, 379-386.
- Chambel, A., Viegas, C.A. y Sá-Correia, I. (1999). "Effect of cinnamic acid on the growth and on plasma membrane H⁺ - ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*". *Int. J Food Microbiol.* 50, 173-179.

Combina M., Daguerre C., Massera A., Mercado L., Sturm M.E, Ganga A. y Martinez C. (2008).” Yeasts identification in with grape juice concentrates from Argentina”. *Lett Appl Microbiol.* 46(2), 192-197.

Cook, A. H. (1958) (Ed.). “The chemistry and biology of yeasts”. Academic Press, Inc., New York.

Corlett, D.A. Jr., y M. H. Brown. (1980). “pH and acidity”. In J. H. Silliker (Ed.), *Microbial ecology of foods*, Vol. I, chap. 5. Academic Press, Inc., New York.

Coroller, L., Leguerinel, I; Mettler, E; Savy,N. y Mafart, P.(2006). “General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves”. *Appl. Environ. Microbiol.*72, 6493-6502.

Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2008).” Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine micoorganisms”. *Food Microbiol.* 25, 422-427.

D’Amato, D., Corbo, M.R., Del Nobile, M.A. y Sinigaglia, M. (2006). Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 1152-1157..

Daudt, C.E. y Ough, C.S (1980). “Action of dimethyl dicarbonate on various yeasts”. *Am. J. Enol. Vitic.* 31 (1), 21-23.

Deak, T. y Beuchat, L. (1993). “Yeast associated with fruit juice concentrates”. *J Food Mycol* 56, 777-782.

Deak, T. y Beuchat, L.R. (1993). “Use of indirect conductimetry for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. *J. Ind. Microbiol.* 12, 301-308.

Deák, T. (Ed.) (2008). Yeasts in specific types of foods. In: *Handbook of Food Spoilage Yeasts* (2nd ed.) CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton.Pp. 117–201

Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A. y Ambró, S. (2002). "Fermentability of Grape Must after Inhibition with Dimethyl Dicarbonate (DMDC)". *J. Agric. Food. Chem.* 50 (20), 5605-5611.

Draper, N.R. y Smith, H. (1981) (Eds). *Applied Regression Analysis*. 2ª Ed., Wiley. New York, USA.

Edlin, D.A.N., Narbad, A., Dickinson, R.J. y Lloyd, D. (1995). "The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*". *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 311-316.

Emmerich, W. y Radler, F., (1983). The anaerobic metabolism of glucose and fructose by *Saccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3311-3318.

Eriksen, J. P. y McKenna, D. N. (1999). "Zygosaccharomyces". In: K. Robinson, C. A. Batt y P. D. Patel (eds) *Encyclopedia of food microbiology*, vol. 3.. London: Academic. Eugster, Pp: 2359–2365.

Evans, D.G., Everis, L.K. y Betts, G.D. (2004). "Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperatura". *Int. J. Food Microbiol.* 92, 55-67.

FAO-OMS. (1993). Directrices para la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos de los Puntos Críticos de Control. Codex Alimentarius.

Fernandez-Espinar M.T., Llopis S., Querol A. y Barrio E. (2011) Molecular identification and characterization of wine yeasts. En: A.V. Carrascosa, R. Muñoz y R. Gonzalez (Eds) Chapter 5: Molecular Wine Microbiology. Amsterdam: Academic Press. Pp 11-141

Fitzgerald, D.J, Stratford, M. y Narbad, A. (2003). "Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin". *Int. J. Food Microbiol.* 86, 113-122.

Flanzy, C. (Ed.) (2000). Tablas de composición. In: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid. AMV ediciones. Pp.218-226.

Fleet, G. (1992). "Spoilage yeasts". *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 1-44.

Fleet, G.H. (2006). "The commercial and community significance of yeasts in foods and beverages production". In: Querol, A., Fleet, G., (Ed.), *The yeast handbook*, vol.2. *Yeast in Food and Beverages*, Springer-Verlag, Germany. Pp: 1-12.

Fleet, G.H. (2011) (Ed). "Yeast Spoilage of Foods and Beverages". In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 5, 53-63.

Frazier, W.C. y Westhoff, D.C. (1993) (Eds.). "Microbiología de los alimentos" (4ª Ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp.: 3-74; 119-154; 191-210.

Fugelsang, K. (1998). "Zygosaccharomyces, a spoilage yeast isolated from grape juice". California Agricultural Technology Institute (CATI) publication no. 980902. Pp: 1-6. Fresno: California State University.

García- Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E.M., Yuste, M., Torres, M., Martín- Alvarez, P.J., Bartolomé, B. y Moreno-Arribas, M.V. (2012). "Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic bacteria growth". *Food Control*. 28, 212-219.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H. y Van Impe, J.F. (2000). "Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment". *Int. J. Food Microbiol.* 59, 185-209.

Genth, H. (1979). "Dimethyldicarbonat – ein neuer verschwindestoff für alkoholfreie, fruchtsafthaltige enfrischungsgetränke". *Erfrisch.getränk Miner.wasser Ztg.* 13, 262-269.

Gould, G.W. (1995). "Homeostatic mechanisms during food preservation by combined methods". *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications. ISOPOW PRACTICUM II*. G.V. Eds. Barbosa-Cánovas y J. Welti-Chanes. Pp: 397-410. Technomic Publication. Pennsylvania, USA.

Grant, W.D. (2004) (Ed) "Life at low water activity" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1250-1266.

Harris, V., Jiranek, V., Ford, C.M. y Grbin, P.R. (2010).” Inhibitory effect of hidroxycinnamic acids on *Dekkera spp*”. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86, 721-729.

Hartley, A. (2008). Bulk shipping of wine and its implications for product quality. Project code MSG009. <http://www.wrap.org.uk>. Last Access date: January 5th , 2012.

Hidalgo Togores, J. (2002) (Ed).” Tratado de enología I”. Editorial Grupo Mundi prensa.

Hocking, M.B. (1997). “Vainillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor”. *J. Chem. Educ.* 74, 1055-1059.

Hoffman, C.S y Wiston, F.A. (1987). “A ten minute preparation from yeast effiiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli Gene*”. 57,267-272.

Holyoak, C.D. (1996). “Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycotoc flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3158-3164.

Houtsma, P.C., DeWit, J.C. y Rombouts, F.M. (1996). “Minimum inhibitory concentration of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms at different pH values and temperaturas”. *J. Food Protect.* 59, 1300–1304.

Infocampo (2011). “Avanza el plan estratégico para el mosto”. <http://www.cavaargentina.com/>

Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) (2013). Estadistica de exportacion de mostos. <http://www.inv.gov.ar/>. Last accession date: February 2nd, 2013.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1980). Microbial ecology of foods. Volume I. Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press, New York.

International Commission on Microbiological Specifications of Foods (ICMSF) (1980). “Bebidas no alcoholicas, zumos de frutas naturales, concentrados y mermeladas”. In:

Ecología Microbiana de los Alimentos, Volumen II. Ed Acribia, Zaragoza. Pp. 652-677.

James, S. y Stratford, M. (2003). "Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*". In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food*. Woodhead Publ. Ltd, Cambridge. Pp: 171-186.

Jay, J.M. (1978) (Ed) "Modern food microbiology". Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Jay, J.M. (1996). "Modern Food Microbiology". Chapman and Hall, New York.

Kalathenos, P., Baranyi, J., Sutherland, J.P. y Roberts, T.A. (1995). A response surface study on the role of some environmental factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food. Microbiol.* 25, 63-74.

Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubs, M., Sols, A. y Bedoya, F. (1983). "Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate". *Biochem. J.* 214, 657-663.

Kurtzman, C.P. (1990). "DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*". *Yeast.* 6, 213-219.

Kurtzman CP, Fell JW (1998).(Eds) "Definition, classification and nomenclature of the yeasts".In: *The Yeasts - A Taxonomic Study*. 4ª Ed. Elsevier, Amsterdam. Pp: 3-5.

Kurtzman CP, Robnett CJ (1998). "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences". *Antonie van Leeuwenhoek.* 74,331-371.

Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. (2004) Chap 16: *Yeasts*. In: G.M. Mueller, G. F. Bills y M.S. Foster (Eds). *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*. Amsterdam, Academic Press.

Kurtzman C. y Fell J. (2006). "Yeast Systematics and Phylogeny – Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology". In: C.Rosa, G. Péter (Eds.) *The Yeast Handbook, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. Pp: 11-30

Leandro, M.J., Sychrova, H., Prista, C. y Loureiro-Dias, M.C. (2011). “The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters”. *Microbiol.* 157, 601-608.

Legan, J.D. y Voyset, P.A. (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 361-371.

Leinberger, D. (2006). “Temperature and humidity in ocean containers”. http://www.ista.org/forms/LEINBERGER_Dimensions06_paper.pdf. Last accession.05.01.12

Leistner, L. y Russel, N.J. (1991) “Solutes and lower water activity”. In N.J. Russel y G.W. Gould (Eds) *Food Preservatives*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. Pp: 111.

López- Malo, A., Alzamora, S.M. y Argai, A. (1995). “Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems”. *Food Microbiol.* 14,117-124.

López- Malo, A., Alzamora, S.M. y Argai, A. (1998).” Vanillin and pH synergistic effects on mould growth”. *J. Food Sci.* 63,143-146.

López-Malo, A. (2000). “La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*”. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina.

Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Marcus, G., Jarman, M.J. y Davies, J.M. (2005) “Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts”. *Microbiol.* 151, 1995-2003.

Martorell, P., Fernández-Espinar, M.T. y Querol, A. (2005). “Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruits nougats to determine food contamination sources”. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 293–302.

Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernandez-Espinar MT.y Querol A. (2007) “Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailli* and

Zygosaccharomyces rouxii isolated from high sugar environments”. *Int. J Food Microbiol.* 114, 234-242.

Matamoros- León, B., Argai, A. y López-Malo, A. (1999). “Individual and combined effects of vanillin and potassium sorbate on *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum*, and *Penicillium italicum* growth”. *J. Food Prot.* 62, 540-542.

McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T. y Ratkowsky, D.A. (Eds.), (1993). “Predictive Microbiology: Theory and Application”. John Wiley and Sons, Inc, New York.

Membré J.M, Kubaczka y M., Chéné, C. (1999) “Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a Bakery Product Spoilage Yeast”. *Appl Environ Microbiol* 65 (11), 4921–4925.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R. y Combina, M. (2007). “Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years”. *Food Microbiol.* 24, 403-412.

Millet y Lonvaud-Funel A. (2000).” The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage”. *Lett. Appl Microbiol.* 30, 136–141.

Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N. y Calder, P.C. (1997). “Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and mobility of bacteria”. *Microbiol Res.* 152, 239-246.

Mossel, D.A.A., y Ingram, M. (1955). “The physiology of the microbial spoilage of foods”. *J. Appl. Bacteriol.* 18:233-268.

Nickerson, J. T. y Sinskey, A. J. (1972) (Eds). “Microbiology of foods and food processing”. American Elsevier Publishing Co., New York.

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V.) (2013) Code of Oenological Practices. Paris: OIV Editions. Pp. 1-318.

Ou S. y Kwok, K.C. (2004). “Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods”. *J. Sci Food Agric.* 84, 1261-1269.

Ough, C.S. (1983). "Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate". In: A.L. Branen and P.M Davidson (Eds), *Antimicrobials in foods*, Marcel Dekker, New York, NY, pp. 299-325.

Panagou, E.Z., Katsaboxakis, C.Z. y Nychas, G.J.E. "Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety". *Int. J. Food Microbiol.* 76,11-18.

Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J. y Kokoska, L. (2013). "Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria". *Int. J. Food Microbiol.* 161, 209-213.

Peleg M. (2006). "Isothermal microbial heat inactivation". En: *Advances Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems. Models for predicting growth and inactivation*. London: Francis Taylor and Francis. Pp: 1-47.

Peleg, M. (2002). "A model of survival curves having an activation shoulder". *J. Food Sci.* 67, 2438-2443.

Piper, P. (2011). "Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives". *Advances in Appl. Microbiol.* 77, 97-110.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997). "Fungi and Food Spoilage". Blackie Academic and Professional, London.

Pozo-Bayón M. Á., Monagas M., Bartolomé B. y Moreno-Arribas M. V. (2012). "Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 31-54.

Praphailong, W. y Fleet, G. H. (1997). "The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14, 459-468.

Ravn. H., Andary, C., Kovacs, G. y Moelgaard, O. (1989). "Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi". *Biochem Syst Ecol.* 17, 175-184.

Renouf, V., Strehaiano, P. y Lonvaud-Funel, A. (2008).” Effectiveness of dimethyl dicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine”. *Food Control*. 19, 208-216.

Restaino, L., Bills, S., Tscherneff, K. y Lenovich, L.M., (1983). “Growth characteristics of *Saccharomyces rouxii* from chocolate syrup”. *Appl. Environ. Microbiol.* 45,1614-1621.

Reyns K.M., Soontjens, C.C., Cornelis, K., Weemaes, C.A., Hendrickx, M.E. y Michiels, C.W.(2000) “Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailli*”. *Int. J. Food. Microbiol.* 56, 199-210.

Rocco A. (2008) “Cadenas productivas: Vid y sus derivados”. *Alimentos Argentinos* .40, 28-31.

Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R. y Manca de Nadra, M.C. (2007). “Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines”. *Food Control*. 18, 93-101.

Rojo, M.C., Arroyo López, F.N., Lerena, M.C., Mercado, L., Torres, A. y Combina, M. (2014). Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiol.* 38, 143-153.

Rose, A.H. y Harrison, J.S. (1971) (Eds). *The yeasts*. Volume II. Physiology and biochemistry of yeasts. Academic Press, Inc., New York.

Rushing, N.D. y Senn V.J. (1964).”Shelf life of chilled orange juice with heat treatment and preservatives”. *Food Technol.* 18,112-114.

Sá-Correia, I., Salgueiro, S.P., Viegas, C.A. y Novais, J.M. (1989). “Leakage induced by ethenol and octanoic and decanoic acids in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Yeast* 5 (Suppl.), S123-S127.

Siloniz, M.I., Valderrama, M.J., Payo, E., y Peinado, M. (1999). “Advances in the development of a methodology to identify common yeast contaminants of high sugar foods products”. *Food Technol Biotechnol.* 37 (4), 277-280.

Siricururatana, P., Iyer, M.M., Manns, D.C., Churey, J.J., Worobo, R.W. y Padilla-Zakour, O. (2013). "Shelf-life evaluation of natural antimicrobials for Concord and Niágara grape juices". *J Food Prot.* 1, 72-78.

Smid, E.J. y Gorris, L.G.M. (1999). "Natural antimicrobials for food preservation". In: Rahman MS (Ed) Handbook of food preservation. CRC, New York. Pp: 285-308.

Smith, J.P., Daifas, D.P., El-Khoury, W. y Koukoutsis, J. (2004). "Shelf life and safety concerns of bakery products". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 19-55.

Splitstoeser, D.F. (1987). "Fruits and fruit products". In: Beuchat, L.R. (Ed.), Food and Beverage Mycology, 2ª Ed. AVI Book, New York. Pp: 101-122.

Stead, D. (1993). "The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria". *J Appl Bacteriol.* 75, 135-141.

Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N. y Stratford, M. (1999). "*Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature". *J. Appl. Microbiol.* 87, 520-527.

Stratford, M. (2006). "Food and beverage spoilage yeast". In: Querol, A., Fleet, G. (Eds.), The yeast handbook. : Yeast in Food and Beverages, Vol. 2. Springer-Verlag, Germany, Pp: 335-379.

Stratford, M., Plumridge, A. y Archer, D.B. (2007). "Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the PAD1 gene". *Appl Environ Microbiol.* 73, 6534-6542.

Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K. y Archer, D.B. (2013). "Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailli*". *Int. J. Food Microbiol.* 166, 126-134.

Stumbo, C. R. (1964). "Heat processing". *Food Technol* 18: 1373-1375.

Suarez, J., Bravo, F. y Inigo, B. (1981) "Estudio microbiológico de mostos concentrados de uva y su aplicación industrial: Aislamiento y clasificación de levaduras". *Revista Alimentaria* 128, 23-26.

Senses-Ergul and Zekiye Yesim Ozbas (2006). "Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products". *J Gen Appl Microbiol.* 52, 99–106.

Tchango Tchango, J., Tailliez. R., Eb, P., Njine, T. y Hornez, J.P. (1997). "Heat resistance of the spoilage yeasts *Candida pelliculosa* and *Kloeckera apis* and pasteurization values for some tropical fruit juices and nectars". *Food Microbiol.* 14,93-99.

Thomas, D.S. y Davenport, R.P. (1985). "*Zygosaccharomyces* -a profile of characteristics and spoilage activities". *Food Microbiol.* 2, 157–159.

Tilbury, R.H. (1980^a). "Xerotolerant yeasts at high sugar concentrations". In: Gould, G.W., Corry, J.E.L. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*, Society for Applied Bacteriology Technical Series, vol. 15. Academic Press, London. Pp: 103-128.

Tilbury, R.H. (1980^b). "Xerotolerant (osmophilic) yeasts". In: Skinner, F.A., Passmore, S.M., Davenport, R.R. (Eds.), *Biology and Activity of Yeasts*, Society for Applied Bacteriology, Symposium Series. Academic Press, London. Pp: 153-179.

Tofalo, R., Chaves-López C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A. y Suzzi, G. (2009)." Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must". *Int. J. Microbiol.* 130, 179-187.

Tompkin, R.B. (1973). "Refrigeration temperature as an environmental factor influencing the microbial quality of food": a review. *Food Technol.* 27(12):54-58.

Tokuoka, K. (1993). "A review: sugar and salt tolerant yeasts". *J. Appl. Bacteriol.* 74, 101-110.

Valente P, Ramos J. y Leoncini O. (1999). "Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy". *Canadian J. Microbiol.* 45, 949-958.

Van Boekel, M.A.J.S (2002)."On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J.Food Microbiol.* 72,159-172.

Van Sumere, C.F., Cottenie, J., De Gref, J. y Kint, J. (1971). "Biochemical studies in relation to the posible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics". *Recent Adv Phytochem.* 4, 165-221.

Vermeulen, A., Dang, T.D.T., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K., Debevere, J., Van Impe, J. y Devlieghere, F. (2008). "Modelling the unexpected effect of acetic and lactic acid in combination with pH and aw on the growth/no growth interface *Zygosaccharomyces bailii*". *Int. J. Food Microbiol.* 124, 79-90.

Vermeulen, A., Daelman, J., Van Steenkiste, J. y Devlieghere, F. (2012). Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF). *Int. J. Food Microbiol.* 32, 332-341.

Walker, T.S., Bais, H.P., Halligan, K.M., Stermitz, F.R. y Vivanco, J.M. (2003). "Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*". *J Agric Food Chem.* 51, 2548-2554.

Walls, I. y Scott, V. (1997). "Validation of Predictive Mathematical Models describing the growth of *Listeria Monocytogenes*". *J. Food Protec.* 60, 1142-1145.

Walters, A. H. (1964). "Microbial resistance". *Food Eng.* 36(11):57.

Warth, A.D. (1977). "Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailli* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives". *J Appl Bact.* 43, 215-230.

Warth, A.D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Appl Env Microbiol.* 54,2091-2095.

Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. (1994). "Microbial modeling". Scientific Status Summary. Institute of Food Technologists, Expert Panel on Food Science and Nutrition. 48, 113-120.

Whiting, R.C. (1995). "Microbial modelling in foods". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. *Food Technol.* 51, 82-86.

Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arinob, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Langee, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T., y Van Impe, J.F. (2002). "Modeling microbial growth in structured foods: towards a unified approach". *J. Food Microbiol.* 73, 275-281.

Zwietering M.H, Jongenburger I, Rombouts F.M. y Van't Riet K. (1990). "Modelling of the bacterial growth curve". *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881

Los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo de Tesis han permitido la publicación de 2 trabajos científicos:

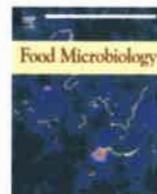
1. Effects of pH and sugar concentration on *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage of concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions. **Rojo M.C.**, Arroyo López F.N., Lerena M.C., Mercado L., Torres A., Combina M. *Food Microbiology* 38, 143-156 (2014).
2. Evaluation of different chemical preservatives to control *Zygosaccharomyces rouxii* growth in high sugar culture media. **Rojo M.C.**, Arroyo López F.N., Lerena M.C., Mercado L., Torres A., Combina M. *Food Control* 50, 349-355 (2015).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions



M.C. Rojo ^{a, c}, F.N. Arroyo López ^b, M.C. Lerena ^{a, c}, L. Mercado ^c, A. Torres ^{a, d},
M. Combina ^{a, c, *}

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, Ciudad Autónoma de Buenos Aires C1033AAJ, Argentina

^b Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa (CSIC), Av. Padre García Tejero 4, 41012 Sevilla, Spain

^c Wine Research Center, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mza INTA), San Martín 3853, Luján de Cuyo, Mendoza 5507, Argentina

^d Microbiology and Immunology Department, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional 36, Km 601, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2013

Received in revised form

5 August 2013

Accepted 29 August 2013

Available online 11 September 2013

Keywords:

Response surface methodology

Zygosaccharomyces rouxii

Concentrated grape juice

pH

Sugar concentration

Spoilage

ABSTRACT

The effect of pH (1.7–3.2) and sugar concentration (64–68 °Brix) on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 using response surface methodology was studied. Experiments were carried out in concentrated grape juice inoculated with *Z. rouxii* at isothermal conditions (23 °C) for 60 days. pH was the variable with the highest effect on growth parameters (potential maximum growth rate and lag phase duration), although the effect of sugar concentration were also significant. In a second experiment, the time for spoilage by this microorganism in concentrated grape juice was evaluated at isothermal (23 °C) and non-isothermal conditions, in an effort to reproduce standard storage and overseas shipping temperature conditions, respectively. Results show that pH was again the environmental factor with the highest impact on delaying the spoilage of the product. Thereby, a pH value below 2.0 was enough to increase the shelf life of the product for more than 60 days in both isothermal and non-isothermal conditions. The information obtained in the present work could be used by producers and buyers to predict the growth and time for spoilage of *Z. rouxii* in concentrated grape juice.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Grape juice and its by-products represent an important part of the food industry in the world. Argentina grape production is mainly industrialized, where wine and concentrated grape juices are the two mayor types of commercial products. Mendoza and San Juan provinces (West of Argentina) are the main manufacturers of concentrated grape juices in the country, with 75% of their production mainly exported to United States, Japan, Russia and México (Bruzone, 1998; INV, 2013). Concentrated grape juice represents a critical additive in several mass consumption products. Due to their natural qualities, concentrated grape juice is employed to

manufacture baby foods, pharmaceutical products, foods and drinks (Bruzone, 1998). Concentrated grape juices are microbiologically more stable than other fruit products due to the high sugar concentration and usually are stored at room temperature without any additional treatment (ICMSF, 1980; Splittstoesser, 1987). However, these products are not free of microbiological spoilage problems. The combination of high concentration of sugar and low pH still support the development of a reduced number of microorganism species. Osmophilic yeasts represent the primary spoilage cause in high sugar food and drink industries, with the genus *Zygosaccharomyces* as the most frequent described spoilage microorganism (ICMSF, 1980; Deák and Beuchat, 1993; Worobo and Splittstoesser, 2005; Martorell et al., 2007).

The genus *Zygosaccharomyces* has a long history of spoilage in the food industry. Three *Zygosaccharomyces* species, *Z. bailii*, *Z. bisporous*, and *Z. rouxii*, have been associated with the spoilage of grape must, concentrated grape juice and wine (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003; Fugelsang and Edwards, 2007; Deák, 2008). Spoilage by *Zygosaccharomyces* species can be categorized

* Corresponding author. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mza INTA), San Martín 3853, Luján de Cuyo, Mendoza 5507, Argentina. Tel.: +54 261 4963020x295.

E-mail addresses: mcombina@mendoza.inta.gov.ar, maricombina@yahoo.com (M. Combina).

into two groups: i) visible growth on the surface of the product, and ii) fermentative spoilage manifested by alcoholic, esteric or other types of odours and/or visible evidence of gas production, leading to bubbling of the product and/or packaging expansion (Legan and Voyset, 1991; Smith et al., 2004).

In a previous study from our group, the osmotolerant and osmophilic yeast population in concentrated grape juice from Argentina was characterized, with *Z. rouxii* being the only yeast species isolated from spoiled products. Moreover, in other samples without visible evidence of spoilage, *Z. rouxii* was also frequently isolated representing 76% of the total yeast population (Combina et al., 2008). The unique physiological characteristics of *Z. rouxii* are largely responsible for their ability to cause spoilage. These include resistance to low-acid preservatives, extreme osmotolerance, ability to adapt to high glucose concentrations, or low activity water (a_w) values and high temperatures, ability to ferment glucose, and ability to growth at low pH values (Emmerich and Radler, 1983; James and Stratford, 2003; Martorell et al., 2007).

Few studies have been carried out to assess the effect of limiting factors on the growth *Z. rouxii*. The vast majority of these studies were performed in culture media and some of them assessed each variable independently (Kalathenos et al., 1995; Praphailong and Fleet, 1997; Membré et al., 1999). Conversely, the response surface (RS) methodology is a very useful tool which has been previously applied to estimate the combined effects of different environmental variables on yeast growth (Arroyo-López et al., 2006; D'Amato et al., 2006). The RS methodology has been widely used in predictive microbiology as a secondary polynomial model to predict the microorganism response as a function of environmental changes determining at the same time the interaction among them (McMeekin et al., 1993).

In this work, the combined effect of the two limiting factors (pH and sugar concentration) on the growth parameters of a native strain of *Z. rouxii* (MC9) previously isolated from spoiled concentrated grape juice was assessed. This task was accomplished using RS methodology, as secondary model. In an effort to provide useful and practical considerations to producers and buyers, the time for spoilage (TFS) was also determined in natural substrate under the standard storage (isothermal) and shipping (non-isothermal) temperature conditions normally found in Argentinean concentrated grape juices.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strain

The strain *Z. rouxii* MC9, previously isolated from spoiled concentrated grape juices, was used in the present study. The strain was identified by molecular sequencing of the D1/D2 domain of the 26S ribosomal gene and registered at the Wine Research Centre Microorganism Collection from INTA, Argentina (GenBank Accession Number KF002711). This strain was selected from a previous study among several native *Z. rouxii* strains because of its better adaptation to concentrated grape juice and fast growth (Rojo et al. unpublished data).

2.2. Media and growth conditions

Z. rouxii MC9 was previously grown on YPD broth (40 g/L glucose, 5 g/L bacteriological peptone, 5 g/L yeast extract, 20 g/L agar) during one day at 28 °C. Before inoculation in natural substrate (concentrated grape juice), the strain was adapted to osmotic shock by growing in a medium (MYGF) with an intermediate concentration of sugar (195 g/L glucose, 195 g/L fructose, 20 g/L malt extract, 5 g/L yeast extract) with pH adjusted to 4.5 by the addition

Table 1

Biological growth parameters of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 (μ_{max} , potential maximum growth rate; λ , lag phase duration) obtained at isothermal conditions (23 °C) for the different treatments (combinations of pH and °Brix) included in the experimental design.

Run	°Brix	pH	μ_{max} (log ₁₀ CFU/mL days ⁻¹)	λ (days)
1	64	1.7	0.000	>60
2	64	1.7	0.000	>60
3	64	1.7	0.000	>60
4	64	2.5	0.360	2.23
5	64	2.5	0.530	1.39
6	64	2.5	0.199	3.07
7	64	3.2	0.417	0.00
8	64	3.2	0.404	0.00
9	64	3.2	0.434	0.00
10	66	1.7	0.000	>60
11	66	1.7	0.000	>60
12	66	1.7	0.000	>60
13	66	2.5	0.287	4.14
14	66	2.5	0.285	1.99
15	66	2.5	0.262	6.29
16	66	3.2	0.455	0.88
17	66	3.2	0.392	1.59
18	66	3.2	0.422	0.17
19	68	1.7	0.000	>60
20	68	1.7	0.000	>60
21	68	1.7	0.000	>60
22	68	1.9	0.058	17.38
23	68	1.9	0.085	17.28
24	68	1.9	0.066	17.33
25	68	2.1	0.140	11.97
26	68	2.1	0.132	8.42
27	68	2.1	0.115	15.52
28	68	2.5	0.181	6.73
29	68	2.5	0.165	12.1
30	68	2.5	0.168	9.37
31	68	3.2	0.185	0.95
32	68	3.2	0.182	2.29
33	68	3.2	0.192	0.00

Note: Values were obtained with the Baranyi and Roberts' model (1994) using DMfit 2.1. program. In the case of no growth, μ_{max} and λ were set to 0.000 log₁₀ cfu/mL days⁻¹ and 60 days, respectively, for modelling purposes.

of citric acid. This last medium was incubated during three days at 28 °C without shaking until the highest possible population was reached (10⁷ CFU/mL) right at the end of exponential growth phase. Experiments were finally performed in concentrated grape juice provided by a local company located in Mendoza (Argentina).

2.3. Experimental design

The different runs (a total of 66) were carried out in 1-L of concentrated grape juice placed in sterile bag-in-box with a Vitop® valve. Bags were placed in metal containers to reproduce the standard storage (isothermal) and overseas shipping (non-isothermal) conditions and monitored for 60 days. The experimental design was obtained from the combination of two variables (pH and sugar concentration) with 3 levels for each variable (Table 1). Variables levels were established taking into consideration a range of conditions usually found in Argentinean concentrated grape juices. The pH values were 1.7, 2.5 and 3.2 and the sugar concentration (expressed as °Brix) were 64 °Brix (779 g/L reducing sugar; a_w : 0.778 ± 0.003), 66 °Brix (810 g/L; a_w : 0.767 ± 0.003) and 68 °Brix (842 g/L; a_w : 0.744 ± 0.003). Two intermediate pH values (1.9 and 2.1) were also evaluated at the sugar concentration condition more frequently required by the market (68 °Brix), yielding a total of eleven different treatments, each performed in triplicate. To achieve the different pH values, grape juices were passed through ion exchange column to obtain the desired pH prior to concentration in order to reproduce industrial

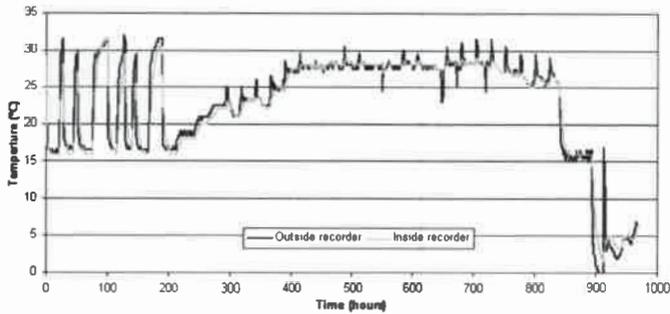


Fig. 1. Inside and outside temperature profiles (non-isothermal conditions) recorded during the experiment to reproduce overseas shipping of concentrated grape juice from the south Hemisphere (summer time) to north Hemisphere (winter time).

conditions. The °Brix of the concentrated grape juices were confirmed using a digital hand-held refractometer (Atago PAL-2, Japan) and the pH was determined using a digital pH meter (Altronix, United States). Each treatment was inoculated with $1.2 \pm 0.2 \times 10^2$ CFU/mL of the strain *Z. rouxii* MC9, which represent the maximum limit accepted for fungi and yeasts count by the local buyers. Un-inoculated bags for each experimental series were also introduced as a negative control. The experiments were conducted at two different temperature systems, namely isothermal condition (23 ± 0.5 °C), to simulate the most frequent storage temperature, and non-isothermal condition, to reproduce the overseas shipping temperature. This last temperature profile was established using as a model the data recorder during wine shipping to destinations in the Northern Hemisphere (Leinberger, 2006; Hartley, 2008). Internal and external temperatures were monitored by *iButton*® temperature data logger placed inside the bag and outside of the metal containers in the control treatments. The recorded non-isothermal profile is shown in Fig. 1, in which three different regions can be observed. The first section of the graph shows the temperature behaviour of the container on the dockside in Santiago (Chile) harbour in summer. The middle section shows a hypothetical sea journey from Santiago (Chile) to the Asian continent (e.g. Japan). The third section of Fig. 1 shows the temperature in the containers on the dockside in the destination harbour in winter. The simulated shipping time was set to 45 days, after which the treatments were maintained at room temperature (23 °C) until completion of the experiment (60 days).

2.4. Modelling yeast growth and time for spoilage

Concentrated grape juice samples at isothermal (23 °C) and non-isothermal conditions were aseptically taken every two days to follow *Z. rouxii* MC9 growth. Samples were decimal diluted in 30% (w/v) glucose to prevent osmotic shock and to allow the recovery of sublethally injured cells. Dilutions were then spread into two culture media. Selective high sugar media: MY50G (a_w 0.89) (Beuchat, 1993) and TGY media (Beuchat et al., 2001) were chosen to detect *Z. rouxii* growth in the concentrated samples. Plates were incubated during 3–5 days at 28 °C before counting. Growth parameters (μ_{max} , potential maximum growth rate; λ , lag phase duration) were calculated from each treatment contemplated in the experimental design by directly fitting plate count (\log_{10} CFU/mL) versus time (days) using the Baranyi and Roberts model (1994). For this purpose, DMfit Software 2.1 was used.

In addition, bags at isothermal and non-isothermal conditions were also daily examined in order to detect signs of fermentative activity such as gas production, bubbling or packaging expansion. Also, the time required for spoilage (TFS, days) was recorded. This spoilage was correlated with a *Z. rouxii* population level in the

Table 2
Regression coefficients estimated by means of the ANOVA analysis for the biological growth parameters (μ_{max} and λ) of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 at isothermal conditions (23 °C).

Regression coefficient	Value	Standard deviation
Model for μ_{max}		
β_0 (Mean/Inter)	-50.035	23.086
β_1 °Brix (L)	1.409	0.696
β_2 °Brix (Q)	-0.010	0.005
β_3 pH (L)	3.765	0.654
β_4 pH (Q)	-0.162	0.037
β_5 °Brix*pH	-0.041	0.009
R^2	0.902	
Lack of fit	0.181	
Pure error	0.061	
Model for λ		
β_0 (Mean/Inter)	-2221.430	683.381
β_1 °Brix (L)	85.390	20.607
β_2 °Brix (Q)	-0.700	0.155
β_3 pH (L)	-419.81	19.365
β_4 pH (Q)	45.270	1.101
β_5 °Brix*pH	2.45	0.285
R^2	0.928	
Lack of fit	0.000	
Pure error	53.940	

Note: Significant coefficients can be determined from their respective Pareto chart.

concentrated grape juice, which was always higher than 10^6 CFU/mL (data not shown).

In the secondary modelling step, growth parameters (μ_{max} and λ) and TFS of *Z. rouxii* MC9 in both temperature systems (IC, isothermal conditions; NIC, non-isothermal conditions) were adjusted to an RS equation as follows:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \epsilon \quad (1)$$

where Y is the parameter modelled (μ_{max} , λ , TFS-IC or TFS-NIC), β_0 is the mean/intercept term, β_i are the coefficients to be estimated during the RS fitting (β_1 is the coefficient for the linear effect of X_1 , β_{11} for the quadratic effect of X_1 , β_{12} for the interaction between variables X_1 and X_2 , and so on), ϵ is the term for error and X_1 and X_2 are the environmental variables under study (pH and sugar concentration (°Brix), respectively). For the main effects, regression coefficients can be interpreted as the increase or decrease (depending of the positive or negative coefficient sign) in the response when the factor changes one unit. Analysis of the RS was made using the Experimental Design module of the Statistica 7.0 software package, using the pure error, derived from repetitions of experiments, as option in the corresponding ANOVAs. Model fitting was also checked by the lack of fit test and the coefficient of determination, R^2 .

3. Results

The combined effect of pH and sugar concentration on the growth parameters of the spoilage yeast *Z. rouxii* MC9 was evaluated in concentrated grape juice at isothermal temperature. Moreover, the TFS of concentrated grape juice inoculated with this microorganism was modelled at isothermal and non-isothermal conditions, obtaining representative data of the product shelf life under experimental conditions.

3.1. Modelling yeast growth at isothermal conditions

Experiments were carried out under storage temperature at 23 °C (isothermal), which allowed to build growth curves and to calculate the growth parameters for the different experimental

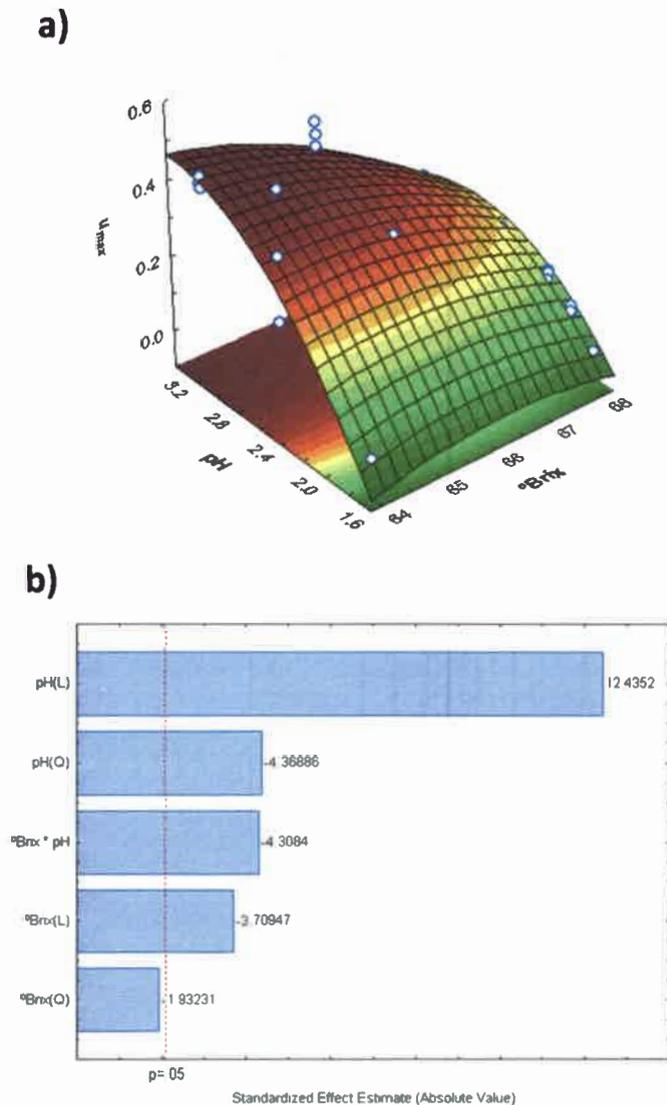


Fig. 2. Response surface (a) and Pareto chart standardized estimate effect of the regression coefficients (b) for potential maximum growth rate (μ_{max} , \log_{10} cfu/mL days $^{-1}$) of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 as a function of pH and sugar concentration (°Brix) at isothermal conditions (23 °C) in concentrated grape juice.

conditions. Table 1 shows the μ_{max} and λ values obtained for the different conditions included in the experimental design. It can be observed in Table 1, λ and μ_{max} at 23 °C changed as the pH and sugar concentration were modified. Specifically, μ_{max} ranged from 0.000 (experiments with pH 1.7) to 0.530 (\log_{10} CFU/mL days $^{-1}$) (pH 2.5 and 64 °Brix), while λ ranged from 0.000 (experiments with the highest pH at 3.2) to >60 days (experiments with the lowest pH value 1.7).

Table 2 shows the regression coefficients obtained from the ANOVA analysis for the growth parameters μ_{max} and λ of *Z. rouxii* MC9 as a function of environmental factors. The variance in the response that was explained by both models was 90.2% for μ_{max} and 92.8% for λ . Therefore, both models can be considered suitable to describe the effects of environmental variables under study (pH and sugar concentration) on yeast growth.

The RS equations that predict the response of both growth parameters as a function of the environmental variables can be deduced from Table 2 by replacing the appropriate coefficients in the general Equation (1). These polynomial equations can be used

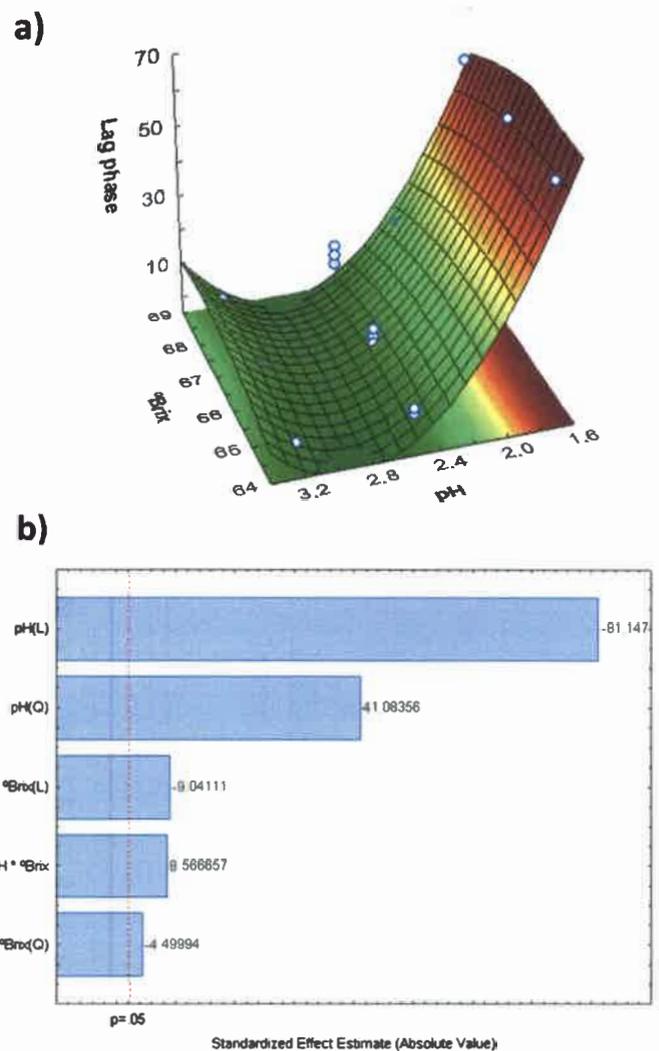


Fig. 3. Response surface (a) and Pareto chart standardized estimate effect of the regression coefficients (b) for lag phase duration (λ , days) of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 as a function of pH and sugar concentration (°Brix) at isothermal conditions (23 °C) in Argentinean concentrated grape juice.

by the industry to predict the behaviour of *Z. rouxii* as a function of diverse combinations of pH and sugar concentration within the studied experimental range (interpolation region). Figs. 2a and 3a show the graphical representation of these equations for μ_{max} and λ , respectively. Both RSs show a clear curvature effect along the pH axis. As pH decreased, the μ_{max} value decreased (positive correlation) while λ increased (negative correlation), suggesting an inhibitory effect of this factor on *Z. rouxii* growth. Figs. 2b and 3b show the Pareto chart for the standardized effect of the studied environmental factors for μ_{max} and λ , respectively. With the exception of the quadratic effect of °Brix for μ_{max} , all regression coefficients were significant at a p -value < 0.05. As it can be observed in Fig. 2b, the highest effects for both growth parameters were observed for pH (linear and quadratic effect), followed by the interaction °Brix * pH and the linear effect of °Brix (in the case of μ_{max}) and the linear effect of °Brix, interaction °Brix * pH, and the quadratic effect of °Brix (in the case of λ). The comparative lower inhibitory effect of sugar concentration on the growth of *Z. rouxii* compared to that of pH was probably due the good adaption of this yeast to high osmotic pressures.

Table 3

Time for spoilage (TFS) of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 in concentrated grape juice at isothermal (IC, 23 °C) and non-isothermal (NIC, variable temperatures) conditions for the different treatments (combinations of pH and °Brix) included in the experimental design.

Run	°Brix	pH	TFS-IC (days)	TFS-NIC (days)
1	64	1.7	>60	>60
2	64	1.7	>60	>60
3	64	1.7	>60	>60
4	64	2.5	15.00	18.00
5	64	2.5	14.00	17.00
6	64	2.5	14.00	17.00
7	64	3.2	13.00	12.00
8	64	3.2	14.00	13.00
9	64	3.2	14.00	12.00
10	66	1.7	>60	>60
11	66	1.7	>60	>60
12	66	1.7	>60	>60
13	66	2.5	26.00	21.00
14	66	2.5	26.00	22.00
15	66	2.5	27.00	21.00
16	66	3.2	14.00	15.00
17	66	3.2	15.00	14.00
18	66	3.2	14.00	14.00
19	68	1.7	>60	>60
20	68	1.7	>60	>60
21	68	1.7	>60	>60
22	68	1.9	>60	>60
23	68	1.9	>60	>60
24	68	1.9	>60	>60
25	68	2.1	48.00	41.00
26	68	2.1	49.00	42.00
27	68	2.1	48.00	42.00
28	68	2.5	35.00	25.00
29	68	2.5	36.00	24.00
30	68	2.5	35.00	24.00
31	68	3.2	26.00	24.00
32	68	3.2	27.00	23.00
33	68	3.2	26.00	24.00

Note: Experiments were followed for a maximum of 60 days. For this reason, when spoilage was not detected after this time, TFS was set at 60 days for model fit.

3.2. Modelling time for spoilage at isothermal and non-isothermal conditions

TFS of *Z. rouxii* MC9 in concentrated grape juice was modelled at both isothermal (IC, 23 °C) and non-isothermal (NIC) conditions. Table 3 shows the TFS values obtained for the different conditions included in the experimental design. As it can be easily seen in Table 3, TFS changed as a function of the pH and the sugar concentration evaluated. Specifically, TFS-IC (23 °C) ranged from 13.66 days (experiments with pH 3.2 and 64 °Brix) to >60 days (experiments with pH 1.7), while TFS-NIC (variable temperatures) ranged from 12.66 days (pH 3.2 and 64 °Brix) to >60 days (runs with the lowest pH value). In general, the treatments conducted at non-isothermal conditions showed a slight lower microbial stability (evidenced in lower TFS values) than those conducted at isothermal conditions (see Table 3). In the most favourable pH value for growth (3.2), increasing the sugar concentration from 64 to 68 °Brix doubled the microbial stability of the product for both temperature conditions.

Table 4 shows the regression coefficients obtained from the ANOVA analysis for the TFS-IC and TFS-NIC of *Z. rouxii* MC9 as a function of the environmental factors under study. The percentage of explained variance by the models was the highest, with 96.7 and 97.6% for TFS-IC and TFS-NIC, respectively. All the regression terms were retained in the mathematical equations, with very similar values for both temperature conditions. Moreover, it is possible to deduce from Table 4 the RS equations that predict the TFS of the concentrated grape juice as a function of pH and sugar

Table 4

Regression coefficients estimated by means of the ANOVA for the Time for Spoilage (TFS) of *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 in concentrated grape juice at isothermal (IC, 23 °C) and non-isothermal (NIC, variable temperatures) conditions.

Regression coefficient	Value	Standard deviation
Model for TFS-IC		
β_0 (Mean/Inter)	2849.592	201.003
β_1 °Brix (L)	-79.148	6.061
β_2 °Brix (Q)	0.596	0.045
β_3 pH (L)	-232.069	5.696
β_4 pH (Q)	20.771	0.324
β_5 °Brix*pH	1.537	0.084
R^2	0.967	
Lack of fit	0.000	
Pure error	4.670	
Model for TFS-NIC		
β_0 (Mean/Inter)	2771.561	210.003
β_1 °Brix (L)	-75.864	6.061
β_2 °Brix (Q)	0.573	0.045
β_3 pH (L)	-228.12	5.696
β_4 pH (Q)	27.544	0.324
β_5 °Brix*pH	0.956	0.084
R^2	0.976	
Lack of fit	0.000	
Pure error	4.670	

Note: Significant coefficients can be determined from their respective Pareto charts.

concentration at storage and overseas shipping temperatures. By replacing the appropriate terms in the general Equation (1), the respective RS equations for TFS are:

$$\begin{aligned} \text{TFS - IC(days)} = & 2849.592 - 79.148(^{\circ}\text{Brix}) + 0.596(^{\circ}\text{Brix})^2 \\ & - 232.069 \text{ pH} + 20.771(\text{pH})^2 \\ & + 1.537(^{\circ}\text{Brix}) * (\text{pH}) \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{TFS - NIC(days)} = & 2771.561 - 75.864(^{\circ}\text{Brix}) + 0.573(^{\circ}\text{Brix})^2 \\ & - 228.12 \text{ pH} + 27.544(\text{pH})^2 \\ & + 0.956(^{\circ}\text{Brix}) * (\text{pH}) \end{aligned} \quad (3)$$

Both equations allow the estimation of the time (in days) that *Z. rouxii* needs to produce visible spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions.

A graphical representation of the combined effect of the limiting growth factors extending the microbial stability of the product at isothermal and non-isothermal conditions is shown in Figs. 4a and 5a, respectively. Both RSs had a very similar morphology. The highest effects were noticed for the linear and quadratic effects of pH (Figs. 4b and 5b). Specifically, a gradual decrease of pH was directly correlated with the increase in the microbial stability of the product, showing a greater difference in the highest concentrations of sugar evaluated. At pH values below 2.5, small variations in the pH caused a significant increase in product's shelf life (see Figs. 4a and 5a). Moreover, concentrated grape juice with pH adjusted below 2.0 allowed to increase the product's shelf life of the product for more than 60 days.

4. Discussion

It has been previously reported that the spoilage of various high-sugar products, such as honey, maple syrup, dried fruits, concentrated fruit juices, raw sugar cane, jams and jellies, is caused mainly by the metabolism of osmophilic yeasts (Deák and Beuchat, 1993; Tokuoka, 1993). Yeasts have been reported to be significant

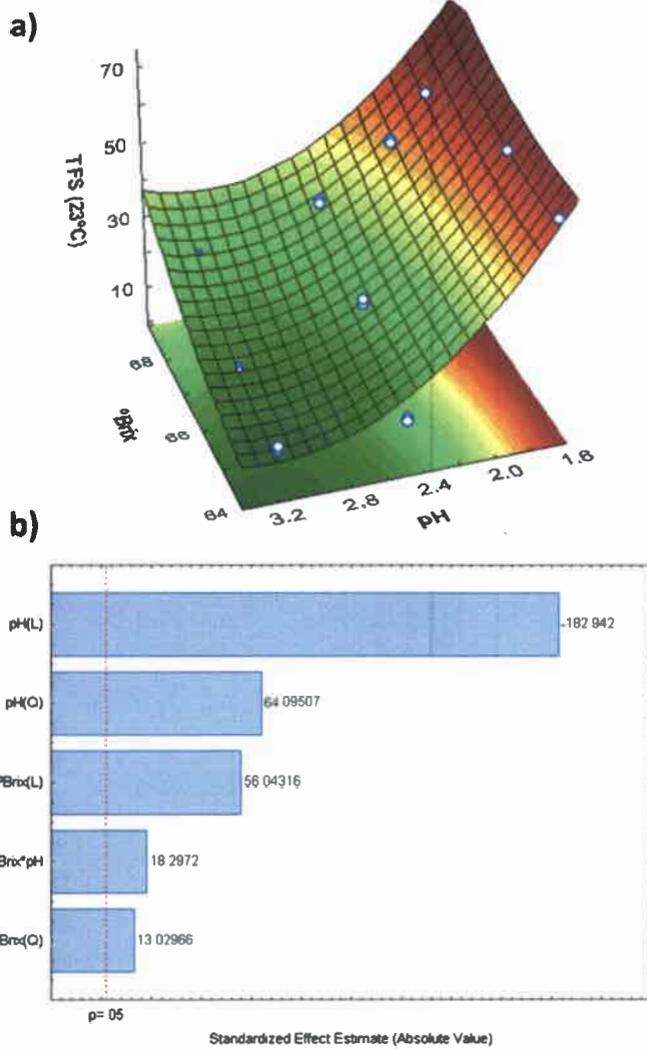


Fig. 4. Response surface (a) and Pareto chart standardized estimate effect of the regression coefficients (b) for time for spoilage (TFS, days) produced by *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 as a function of pH and sugar concentration (°Brix) at isothermal conditions (IC, 23 °C) in concentrated grape juice.

spoilage organisms, especially in food systems with low pH and high sugar concentrations. Also yeasts are responsible for spoilage in products containing sorbate and benzoate as preservatives as well as in the presence of alcohol where most bacterial species are inhibited (Praphailong and Fleet, 1997; Evans et al., 2004). Many environmental factors affect the yeast growth, but the response to each particular condition differ among the species (Praphailong and Fleet, 1997).

In order to design the adequate strategies to prevent spoilage, it is advantageous to know the identity of the spoilage microorganisms present in the products and in order to get an insight into the contamination source (Loureiro, 2000). In a previous study from our group, *Z. rouxii* has been described as the main microbiological agent responsible for the spoilage in concentrated grape juice in Argentina (Combina et al., 2008).

Many yeast species are able to tolerate a wide range of pH, from pH 1.5 to 10.0. In fact, most yeasts prefer a slightly acidified medium, between 3.5 and 6.0, which is the pH found in most fruit juices, beverages and soft drinks. Water activity of foods is also a very important factor that limits yeast growth. While most yeasts

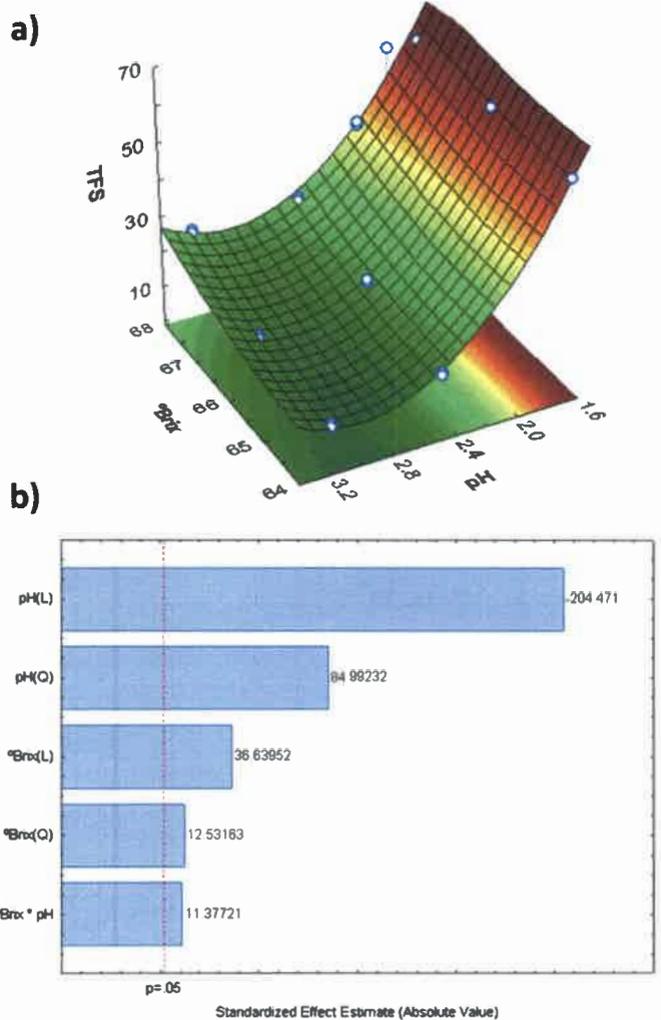


Fig. 5. Response surface (a) and Pareto chart standardized estimate effect of the regression coefficients (b) for time for spoilage (TFS, days) produced by *Zygosaccharomyces rouxii* MC9 as a function of pH and sugar concentration (°Brix) at non-isothermal conditions (NIC) in concentrated grape juice.

will easily grow in 20% (w/v) glucose, only a limited number of yeast species are able to grow at low a_w produced by the presence of high sugar concentration (60% w/v) (Tilbury, 1980a,b). Moreover, *Z. rouxii* is able to grow in a wide range of pH values, such as pH 1.8 to 8.0 in the presence of high sugar concentration (Tokuoka, 1993) or pH 1.5 to 10.5 in 12% glucose medium (Restaino et al., 1983). In a well-documented review of spoilage yeasts, Fleet (1992) suggested that high sugar concentration may either increase or decrease the low-pH tolerance of yeasts and emphasized that a further study of these influences would be needed to clarify these discrepant observations. In this paper, we study the combined effects of pH and high sugar concentrations on *Z. rouxii* growth and TFS evaluated in natural substrate under two temperature conditions to mimic product storage and shipping overseas.

Membré et al. (1999) described the combined effects of pH and high sugar concentration on *Z. rouxii* growth rate in laboratory culture media. Our results suggest a partial agreement with these authors' observations. In their publication they found that increasing the sugar concentration from 300 (a_w : 0.957) to 800 g/L (a_w : 0.843) resulted in a reduction of the specific growth rate. Furthermore, they observed that the growth rate at high sugar

concentrations, such as 875 (a_w : 0.810) and 950 (a_w : 0.788) g/L, was very low. pH of 2.5 resulted in a 30% reduction in the growth rate, and no growth occurred at pH 2.0 at any sugar concentration assessed. In the present work, a pH of 1.9 allowed a slow growth of *Z. rouxii* in concentrated grape juice at 23 °C, whereas no growth was observed after 60 days at pH 1.7. The minimum pH value which allows the growth of *Z. rouxii* has been reported to be dependent on the strain, the culture medium employed and the compound used to acidified the medium (Splittstoesser, 1987; Tokuoka, 1993). For instance, Martorell et al. (2007) found that pH 2.2 was the minimal pH for growth of two *Z. rouxii* strains in a culture medium modified by adding HCl. On a separate report, Restaino et al. (1983) found that the growth of *Z. rouxii* was inhibited at pH 1.5 evaluated under similar conditions. However, when the pH value was adjusted with citric acid or other citrate/phosphate buffers, the minimal pH value to support *Z. rouxii* growth was 2.0 (Praphailong and Fleet, 1997; Membré et al., 1999). In the present study, the decrease in pH was obtained by treating the grape juice with an ion exchange column. This fact highlights the importance of evaluating the growth of spoilage yeast in natural substrates using acidification methods normally employed by the industry.

Praphailong and Fleet (1997) concluded that 700 g/L of glucose was the highest sugar concentration at which *Z. rouxii* proliferated. This value is not consistent with the results obtained in the present study, since increasing the sugar concentration in concentrated grape juice to levels as high as 842 g/L (68 °Brix) did not greatly affect *Z. rouxii* growth. Our results are in agreement with others authors' reports, who have evidenced the growth of *Z. rouxii* at low a_w levels, such as 0.650 (Legan and Voyset, 1991; Tokuoka, 1993). Moreover, Martorell et al. (2007) have reported that two *Z. rouxii* strains isolated from spoil syrup were able to grow in medium containing 900 g/L of glucose.

In this study, we have shown by using RS methodology, that the main limiting factor that affect *Z. rouxii* growth was the pH, mainly when its value was below 2.1. In a recent work, Vermeulen et al. (2012) studied the influence of environmental stress factors on the growth/no growth boundary of *Z. rouxii*. The authors found that pH decrease from 7.0 to 3.5 had almost no effect on the detection time of the different *Z. rouxii* strains. Only pH values below 2.5 had a significant effect on the detection time with an increase of approximately 4–40 days. However, this pH value was over the relevant range of the target product (chocolate filling) and it was not included in the model design. Furthermore, even the strictest conditions assessed (pH 5.0 and a_w 0.76), could still support *Z. rouxii* growth (Vermeulen et al., 2012). These observations are in line with our results, where the increase in sugar concentration was not enough to inhibit the growth of this spoilage species in concentrated grape juice.

The decrease in the pH values in concentrated grape juice leads to an increase in the time required for spoilage. An extension of the self life for over 30 days represents a huge marketing advantage, since by that time the product should have arrived to the destination. Moreover, TFS was above 60 days when pH was below 2.1 units, independently of the sugar concentration and temperature conditions. Also, TFS of concentrated grape juice was slightly lower when a non-isothermal profile was applied. This may be due to the extreme and oscillating temperatures during the first week of this assay which produced water evaporation and subsequent condensation on the substrate surface, increasing a_w and promoting the onset of spoilage. It is also important to note that the concentrated grape juice was inoculated with $1.2 \pm 0.2 \times 10^2$ CFU/mL, which represent the maximum limit for fungi and yeasts count accepted by the buyers. This represents a worst-case scenario, because the concentrated grape juice contains the maximum yeast count tolerated by current industry standards. Therefore, the data

presented here represents the minimum microbial stability period for this substrate.

5. Conclusions

The results of the mathematical modelling of the variables under study (pH and sugar concentration) suggest that it is advisable for producers and buyers to obtain pH values below 1.7 to achieve total inhibition of *Z. rouxii* MC9 in concentrated grape juices. However, this pH value could be difficult to achieve under industrial conditions. Alternatively, reducing the pH up to values of 2.0 may be enough to significantly increase the shelf life of the product at 68 °Brix for both storage and shipping overseas temperature conditions.

Acknowledgements

This research was supported by the Technological Project MZASJ51007: Support for Regional Viticulture Development – INTA. The authors wish to thank to the concentrating grape juice industry for providing all the samples used in the present study. M.C. Rojo is a Doctoral student Fellow of CONICET. F.N. Arroyo-López wants to thank CSIC and Spanish government for his Ramón Cajal postdoctoral research contract.

References

- Arroyo-López, F.N., Durán Quintana, M.C., Garrido Fernández, A., 2006. Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, a yeast related to table olive fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 45–51.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277–294.
- Beuchat, L.R., 1993. Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 1–14.
- Beuchat, L., Frandberg, E., Deák, T., Alzamora, S., Chen, J., Guerrero, S., López-Malo, A., Ohlsson, I., 2001. Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 89–96.
- Bruzzone, A., 1998. Cadenas alimentarias: Jugo de uva concentrado. *Aliment. Argent.* 8, 42–45.
- Combina, M., Daguerre, C., Massera, A., Mercado, L., Sturm, M.E., Ganga, A., Martínez, C., 2008. Yeasts identification in with grape juice concentrates from Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2), 192–197.
- Yeasts in specific types of foods. In: Deák, T. (Ed.), *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, second ed. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 117–201.
- Deák, T., Beuchat, L., 1993. Yeast associated with fruit juice concentrates. *J. Food Microbiol.* 56, 777–782.
- D'Amato, D., Corbo, M.R., Del Nobile, M.A., Sinigaglia, M., 2006. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 1152–1157.
- Emmerich, W., Radler, F., 1983. The anaerobic metabolism of glucose and fructose by *Saccharomyces baillii*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 3311–3318.
- Evans, D.G., Everis, L.K., Betts, G.D., 2004. Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, ph, sucrose, sorbate and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 55–67.
- Fleet, G., 1992. Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 1–44.
- Yeasts. In: Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (Eds.), *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures*, second ed. Springer Science, New York, pp. 3–14.
- Hartley, A., 2008. Bulk Shipping of Wine and Its Implications for Product Quality. Project code MSG009 <http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/Bulk%20shipping%20%20wine%20quality%20May%08.pdf> (last accessed 05.01.12.).
- ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications of Foods, 1980. Bebidas no alcohólicas, zumos de frutas naturales, concentrados y mermeladas. In: *Ecología Microbiana de los Alimentos*, vol. II. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 652–677.
- INV – Instituto Nacional Vitivinícola, 2013. Estadística de exportación de mostos. <http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/Exportaciones/2013/ComparativoMosto.pdf>. Last accession date: February 2nd, 2013.
- James, S., Stratford, M., 2003. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food*. Woodhead Publ. Ltd, Cambridge, pp. 171–186.
- Kalathenos, P., Baranyi, J., Sutherland, J.P., Roberts, T.A., 1995. A response surface study on the role of some environmental factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 63–74.

- Legan, J.D., Voyset, P.A., 1991. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 361–371.
- Leinberger, D., 2006. Temperature and Humidity in Ocean Containers. http://www.ista.org/forms/LEINBERGER_Dimensions06_paper.pdf (last accessed 05.01.12.).
- Loureiro, V., 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Res. Int.* 33, 247–256.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23–50.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M.T., Querol, A., 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 234–242.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D.A. (Eds.), 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Membré, J.M., Kubaczka, M., Chene, C., 1999. Combined effects of pH and sugar on growth rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a bakery product spoilage yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4921–4925.
- Praphailong, W., Fleet, G.H., 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14, 459–468.
- Restaino, L., Bills, S., Tscherneff, K., Lenovich, L.M., 1983. Growth characteristics of *Saccharomyces rouxii* from chocolate syrup. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1614–1621.
- Smith, J.P., Daifas, D.P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 19–55.
- Splittstoesser, D.F., 1987. Fruits and fruit products. In: Beuchat, L.R. (Ed.), *Food and Beverage Mycology*, second ed. AVI Book, New York, pp. 101–122.
- Tilbury, R.H., 1980a. Xerotolerant yeasts at high sugar concentrations. In: Gould, G.W., Corry, J.E.L. (Eds.), *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*, Society for Applied Bacteriology Technical Series, vol. 15. Academic Press, London, pp. 103–128.
- Tilbury, R.H., 1980b. Xerotolerant (osmophilic) yeasts. In: Skinner, F.A., Passmore, S.M., Davenport, R.R. (Eds.), *Biology and Activity of Yeasts*, Society for Applied Bacteriology, Symposium Series. Academic Press, London, pp. 153–179.
- Tokuoka, K., 1993. A review: sugar and salt tolerant yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 101–110.
- Vermeulen, A., Daelman, J., Van Steenkiste, J., Devlieghere, F., 2012. Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF). *Int. J. Food Microbiol.* 32, 332–341.
- Worobo, R.W., Splittstoesser, D.F., 2005. Microbiology of fruit products. In: Barret, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H. (Eds.), *Processing Fruit*, second ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 161–284.



Evaluation of different chemical preservatives to control *Zygosaccharomyces rouxii* growth in high sugar culture media



M.C. Rojo^a, F.N. Arroyo López^b, M.C. Lerena^{a,c}, L. Mercado^c, A. Torres^{a,d},
M. Combina^{a,c,*}

^a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917 (C1033AAJ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa (CSIC), Av. Padre García Tejero 4, 41012, Seville, Spain

^c Oenological Research Center, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mza INTA), San Martín 3853 (5507) Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina

^d Microbiology and Immunology Department, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional 36, KM 601, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2014

Received in revised form

6 September 2014

Accepted 13 September 2014

Available online 22 September 2014

Keywords:

Chemical preservatives

Osmophilic yeast

Predictive models

Zygosaccharomyces rouxii

ABSTRACT

Zygosaccharomyces rouxii is an osmophilic yeast responsible for a large amount of economic loss in high sugar food production. Statistical modelling techniques were used in the present study to assess the individual effects of different chemical preservatives (potassium sorbate, sodium benzoate, dimethyldicarbonate, vanillin, ferulic, *p*-coumaric and caffeic acids) to control the growth of a cocktail of five yeast strains belonging to this species and isolated from spoiled concentrated grape juices. None of the preservatives assayed were able to completely inhibit the *Z. rouxii* growth. However, the mathematical models obtained in a high sugar culture media showed that especially four preservatives (potassium sorbate, sodium benzoate, dimethyldicarbonate and vanillin) were the best options to control the growth of this microorganism, obtaining a maximum reduction on yeast growth of approximately 40%. On the contrary, *p*-coumaric and caffeic acids were the preservatives with the lower effects, which only showed a maximum growth reduction percentage of approximately 15%. Results obtained in this paper could be very useful for industry for a better control of this spoilage yeast in concentrated grape juice.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Osmotolerant and osmophilic yeasts are the most common spoilage agents of sugar-rich foods, where water activity (a_w) is the main limiting factor for microbial growth (Deak & Beuchat, 1994). Among all yeast species recognized, only a small fraction (about 10 yeast species), are responsible for major losses in processed foods around the world (Pitt & Hocking, 1997). The importance of these spoilage yeasts is increasing, because in the modern world a great proportion of foods are being processed, preserved in some form, and stored or transported over long distances before consumption. Spoilage yeasts most frequently described in sugar food and drink industries are those belonging to *Zygosaccharomyces* genus. Spoilage resulting from growth of the yeast *Zygosaccharomyces* is

widespread and has caused considerable economic losses in the food industry (Fleet, 2011). Food containing high concentrations of sugar (40–70%) includes sugar cane, sugar syrups, honey, concentrate fruit juices, jams, jellies and dried fruits. Their spoilage by yeasts is not uncommon, with *Zygosaccharomyces rouxii* being most frequently implicated because of its unique ability to tolerate the high osmotic stresses and low a_w conditions of these products, and also due to its resistance to different preservatives (Fleet, 2011; Martorell, Stratford, Steels, Fernández-Espinar, & Querol, 2007; Stratford et al., 2013). Occasionally, other yeasts are also found and these include *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* and various *Candida* species (Combina et al., 2008; Martorell et al., 2007; Stratford, 2006). Spoilage activity by *Zygosaccharomyces* can lead to excessive gas production in foods. The amount of CO₂ generated can be sufficient to distort packaging, and break cans or kegs (Grimbaum, Ashkenazi, Treister, Goldschmied-Reouven, & Block, 1994).

In a previous study, we have characterized the osmophilic and osmotolerant yeast species present in Argentinean concentrated

* Corresponding author. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mza INTA). San Martín 3853 (5507) Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina. Tel.: +54 261 4963020x295.

E-mail addresses: maricombina@yahoo.com, combina.mariana@inta.gob.ar (M. Combina).

grape juice. *Z. rouxii* was the only yeast species isolated from spoiled concentrated grape juices and it was the main yeast species present in unspoiled samples followed by lower proportions of other yeast species (Combina et al., 2008). We have also shown that the spoilage depends on the size of the initial inoculum as well as the strain ability to grow under certain conditions (Combina et al., 2008). We confirmed that the visual sign of spoilage become noticeable when yeast growth reaches approximately 10^4 – 10^5 CFU/g and are clearly evident at 10^6 – 10^7 CFU/g (Combina et al., 2008; Fleet, 2011). In a recent work performed by our group, the microbiological stability of the concentrated grape juice according their pH and sugar concentration was established. Results allowed us to propose a model system to determine the intrinsic stability of the product and to define the juice parameters (pH and a_w) for increasing microbial stability (Rojo et al., 2014). However, when the product has a high population of osmophilic yeast, the adjustment of these parameters is not enough to inhibit microbial growth and to extend the shelf life long enough to allow the exportation of the product. Thus, it is necessary to develop other technological tools to obtain a reduction in this population, without affecting the sensorial characteristics of the concentrated grape juice.

The control of spoilage yeasts is one of the most important aspects in food preservation. Factors such as low temperature, reduce a_w , addition of preservatives and low pH, are all used to inhibit yeast species and other microorganisms (Hidalgo Togoires, 2002; Marechal, Martinez de Marnanon, Poirier, & Gervais, 1999). Moreover, the addition of preservatives in foods has been used for centuries. The most commonly used food preservatives are weak acids, such as sorbic, benzoic, propionic, and acetic acids and sulfur dioxide (sulphite), some of which occur naturally in foods (fruits and vegetables) (Piper, 2011). Weak acid preservatives are widely used in sugar containing low-pH foods such as fruit juices, beverages, wine, dressings and sauces, in which spoilage is most often caused by yeasts, moulds and lactic acid bacteria (Beuchat, 1982; Vermeulen et al., 2008). Yeast resistance and even metabolism of such preservatives raises problems for the food industry; causing a requirement for increased preservative levels in low-pH foods to prevent yeast spoilage (Piper, 2011).

Dimethyldicarbonate (DMDC) is a chemical preservative that has recently been approved for the control of spoilage yeasts in wines (Martorell et al., 2007; OIV, 2013). It has been demonstrated that more than 3 mM DMDC is necessary for a complete inhibition of alcoholic fermentation conducted by different yeast species (Costa, Barata, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2008; Delfini et al., 2002). Also, Renouf, Strehaiano, and Lonvaud-Funel (2008) have suggested that DMDC should not be used as a preventive agent but only as curative agent against unwanted populations already present in wine.

Nowadays, modern consumers prefer high quality foods that are more natural, minimally processed and preservative free. This latter along with stricter legislation regarding current preservatives has challenged the food industry leading to increased research into the use of "naturally derived" antimicrobials. Over the last two decades, other preservatives from plant, animal and microbial origins have been intensely investigated for practical applications (Pozo-Bayón, Monagas, Bartolomé, & Moreno-Arribas, 2012). Thereby, vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) is the major constituent of vanilla beans and is the main flavouring compound used in numerous foods such as ice cream, chocolate and confectionary products. Moreover, recent reports have shown that vanillin can be an effective inhibitor of yeasts and moulds when tested in fruit purees and fruit based agar systems (López-Malo, Alzamora, & Argai, 1995; López-Malo, Alzamora, & Argai, 1998). Additionally, different studies have demonstrated the potential application of phenolic extract as antimicrobial and antioxidant agents in order to

prevent food spoilage and to prolong the shelf life of final products (García-Ruiz et al., 2012). Hydroxycinnamic acids (HCAs) are endogenous components of grapes and are considered natural food preservatives (Ou & Kwok, 2004; Smid & Gorris, 1999). The most abundant HCAs in grapes are caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids, in decreasing order (Flanzy, 2000). HCAs have been reported to inhibit growth of a variety of organisms including fungi and bacteria (Campos, Couto, & Hogg, 2003; Ravn, Andary, Kovacs, & Moelgaard, 1989; Stead, 1993; Van Sumere, Cottenie, De Gref, & Kint, 1971; Walker, Bais, Halligan, Stermitz, & Vivanco, 2003). In particular, the growth of a number of yeast species is inhibited by HCAs in concentrations over 1 mM, with ferulic and *p*-coumaric acids being generally found to be the most inhibitory (Harris, Jiranek, Ford, & Grbin, 2010; Ou & Kwok, 2004; Pastorkova et al., 2013).

In the present work, seven chemical preservatives were assessed to control the growth of *Z. rouxii* in a high sugar culture media, in order to find a new strategy for preservation of concentrated grape juices. The study was carried out by using a modelling approach, obtaining diverse mathematical equations useful to determine the percentage of growth reduction of this microorganism as a function of preservative concentration.

2. Material and methods

2.1. Yeast strains

Five strains belonging to *Z. rouxii* species (MR4, MT6, MC8, MC9 y MC10) previously isolated from spoiled Argentinean concentrated grape juices were used in the present study (Combina et al., 2008). Strains were previously identified by molecular sequencing of the D1/D2 domain of 26S ribosomal gene and registered at the Wine Research Centre Microorganism Collection from INTA (Mendoza, Argentina).

2.2. Yeast cocktail preparation

First, the five *Z. rouxii* strains were independently grown during 24 h at 28 °C on YPD broth (40 g/L glucose (Biopack Co.), 5 g/L bacteriological peptone (Britania Co.), 5 g/L yeast extract (Britania Co.) and 20 g/L agar (Britania Co.)). Then, a high sugar culture media MYGF 195 g/L glucose (Biopack Co.), 195 g/L fructose (Biopack Co.), 20 g/L malt extract (Britania Co.), 5 g/L yeast extract (Britania Co.) adjusted to pH 4.5 by citric acid addition) was prepared and inoculated with the different strains to form a cocktail of approximately 10^4 CFU/mL. Finally, yeasts were incubated in this high sugar culture media during 48 h at 28 °C without shaking until the yeast population reached 2×10^7 CFU/mL.

2.3. Modelling of the individual effects of preservatives on *Z. rouxii* growth

The effect of preservatives on yeast growth cocktail was studied using MYGF as basal medium supplemented with different doses of the following chemical compounds: potassium sorbate (Sigma–Aldrich Co., St. Luis, USA), sodium benzoate (Sigma–Aldrich Co.), dimethyldicarbonate (Velcorin®), vanillin (Sigma–Aldrich Co.) and different hydroxy-cinnamic acids such as ferulic, *p*-coumaric and caffeic acids (Sigma–Aldrich Co.). The first three preservatives were selected considering the products approved by the International Organization of Vine and Wine (OIV) and the National Viticulture Institute (INV, Argentina), whereas the last preservatives were selected by their natural character and its promising antimicrobial activities in food industry. Chitosan (Lallemand Co.) was also evaluated, but no effect on *Z. rouxii* growth was detected (data not

shown). Thus, it was not included in the present study. Table 1 shows the ranges tested for each inhibitory compound used and their respective stock mother solutions.

The assays were conducted in microtiter plates using an automatic spectrophotometer model Bioscreen C (Labsystem, Finland). This spectrophotometer uses two microtiter plates with 100 wells each one. Therefore, 200 assays were conducted simultaneously. The wells of the microplate were filled with 350 μ L of MYGF medium supplemented with the different chemical preservatives (Table 1) and 20 μ L of inoculum, reaching an initial inoculum level of 1×10^6 CFU/mL. The inocula were always above the detection limit of the apparatus, which was determined by comparison with a calibration curve previously established. Un-inoculated wells for each experimental series were also included in the microtiter plate to determine, and consequently subtract, the noise signal. Therefore, a total of 273 growth curves (13 levels of each preservative \times 7 preservatives \times 3 replicates) were obtained and analysed. Assays were conducted at 28 °C and optical density (OD) measurements were performed after a pre-shaking of 20 s every 2 h during 7 days.

The inhibitory effect microorganism growth increases with higher preservative concentrations. This effect on the growth is manifested by a reduction in the area under the OD–time curve relative to the positive control (absence of preservative). The areas under the OD–time curves were calculated by integration using OriginPro 7.5 software (OriginLab Co.). The relative growth for each preservative concentration, denoted as the fractional area (fa), was obtained using the ratios of the test area (area_{test}) and the positive control of the yeast (area_{cont}, without preservative), according to the following formula:

$$fa = (\text{area}_{\text{test}}) / (\text{area}_{\text{cont}})$$

Then, growth reduction (Gr) percentage was estimated according to the following formula:

$$Gr = (1 - fa) * 100$$

This parameter has the premise that in the absence of preservatives the growth of microorganism is the maximum and the fa is 1. Thus, in this case, the Gr consequently will be 0. The plot of the Gr versus preservative concentration produced a sigmoid–shape curve that was fitted with the reparameterized Gompertz equation proposed by Zwietering, Jongenburger, Rombouts, and Van't Riet (1990), which has the following expression:

$$Gr = A * \exp \left\{ - \exp \left\{ (r * e * (c - x)) / A + 1 \right\} \right\}$$

where x is the preservative concentration assayed (mM), A is the maximum Gr reached (%), r is the maximum rate of change (mM⁻¹) and c is the preservative concentration (mM) above which Gr begins. These parameters were obtained by a nonlinear regression procedure, minimizing the sum of squares of the difference between the experimental data and the fitted model, i.e. loss function (observed – predicted). This task was accomplished using the nonlinear module of the Statistica 7.0 software package (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) and its Quasi-Newton option. Fit adequacy was checked by the proportion of variance explained by the model (R²) with respect to experimental data.

Finally, an analysis of variance was performed by means of the one-way ANOVA module of Statistica 7.1 software to check for significant differences among fitted parameters obtained from the different preservatives. For this purpose, a post-hoc comparison was applied by means of the Fisher LSD test.

Table 1
Concentration ranges of the chemical preservatives assayed in the present study.

Preservatives ^a	Tested concentrations (mM)
Potassium sorbate	0, 0.3, 0.7, 1.3, 2.0, 2.7, 3.3, 4.0, 4.7, 5.3, 6.0, 6.7, 10.0
Sodium benzoate	0, 0.3, 0.7, 1.4, 2.1, 2.8, 3.5, 4.2, 4.9, 5.6, 6.2, 6.9, 10.4
Dimethyldicarbonate (DMDC)	0, 1.9, 2.7, 4.0, 5.3, 6.7, 8.0, 9.3, 10.6, 12.0, 13.3, 14.6, 16.0, 17.3
Vanillin	0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 25.0, 30.0
Caffeic acid	0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 22.0
Ferulic acid	0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 22.0
p-coumaric acid	0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0, 22.0

^a A stock solution of each preservative was prepared, except for dimethyldicarbonate (99.9% w/v purity) which was added directly from a mother solution of 9.3 M. For potassium sorbate and sodium benzoate the mother solution was 120 mM in sterile water, for vanillin 0.7 M in ethanol, while for hydrocinamic acids was 0.35 M in ethanol.

3. Results

In the present study, the individual effect of seven different chemical preservatives on the growth of a *Z. rouxii* cocktail was evaluated in an automated spectrophotometer by analysing a total of 273 OD growth curves obtained in a high sugar culture media. In this work the main results obtained after mathematical modelling of experimental data, which always had a R² value above 0.90, are shown.

Within the concentration range tested, none of the preservatives assayed was able to completely inhibit the growth of the *Z. rouxii* cocktail. However, they were able to partially inhibit yeast growth in different percentages. Fig. 1 shows as an example, the fit with the reparameterized Gompertz equation for one of the three series obtained for Gr experimental data of *Z. rouxii* cocktail as a function of potassium sorbate and sodium benzoate concentrations. Clearly, the whole sigmoid-shaped curve can be divided into three sections: i) a first section corresponding to preservative concentrations with Gr around 0, ii) preservative concentrations above which Gr progressively increased, and iii) a third section where maximum Gr was obtained. As can be deduced from Fig. 1, the yeast behaviour was different depending of the preservative assayed, with a curve shifter to the right (lower inhibitory effect) in the case of sodium benzoate.

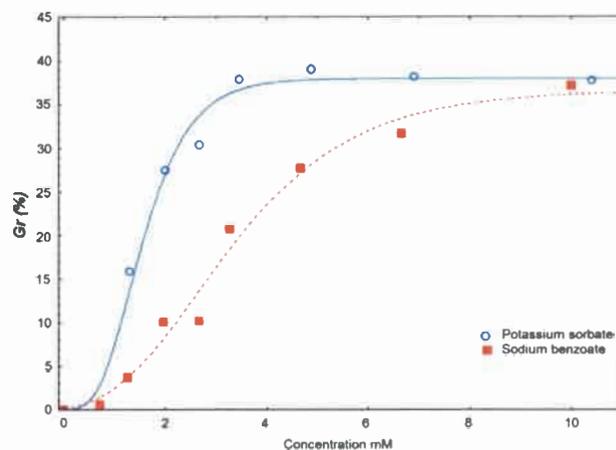


Fig. 1. Fit with the reparameterized Gompertz equation for the growth reduction (Gr) experimental data deduced from the fa obtained for potassium sorbate and sodium benzoate concentrations.

Table 2 shows the parameters obtained after the mathematical fit of the different preservatives. Parameter *A*, related to the maximum percentage of Gr obtained, ranged from 14.9% (*p*-coumaric acid) to 39.9% (vanillin), parameter *r* (rate of change) ranged from 0.595 mM⁻¹ (caffeic acid) to 190.950 mM⁻¹ (DMDC), while parameter *c* (preservative concentration above which inhibition begins) ranged from 0.106 mM (DMDC) to 6.67 mM (caffeic acid).

From fitted parameters, it is possible to get the mathematical equations to estimate how *Z. rouxii* reduces its growth as a function of the different preservative concentrations. Graphical representations of these equations are shown in Fig. 2. Among the legally approved preservatives, it is clearly deduced that DMDC was the most effective compound (with one of the highest *A* and *r* values and the lowest *c* value), with the curve most shifted to the left. As also shown in Fig. 2, the sigmoid-curve for potassium sorbate was clearly above sodium benzoate, which is indicative of the higher inhibitory effect of the former preservative. Among “naturally derived” preservatives, vanillin was clearly the most effective preservative to partially inhibit *Z. rouxii* growth (Fig. 2). Specifically, among HCAs preservatives, ferulic acid was the most effective inhibitor, reaching the maximum Gr percentage at lower doses compared to the other two HCAs tested. The minimal inhibitory effect was observed for caffeic acid, where doses higher than 40 mM were necessary to achieve the maximum Gr (Fig. 2).

Finally, Fig. 3 shows the ANOVA analysis carried out for the maximum Gr obtained (*A*) for the different chemical preservatives. Clearly, *p*-coumaric and caffeic acids showed the lowest inhibitory effect, without significant differences between them, obtaining only a 15% of yeast Gr. Ferulic acid exhibited about 30% of maximum Gr, while sodium benzoate, potassium sorbate, vanillin and DMDC formed a statistically homogeneous group with the highest Gr values reached (around 40%).

4. Discussion

OD measurements are usually used in predictive microbiology to assess microbial response as a function of environmental variables and chemical compounds by using diverse methodologies such as time to turbidity (Cuppers & Smelt, 1993) or fa (Bautista Gallego, Romero Gil, Garrido Fernández, & Arroyo López, 2012). Three of the preservatives assayed (potassium sorbate, sodium benzoate and DMDC) are chemical compounds approved to be used in grape must and wine, using in this work the maximum dose range allowed by the International Organization of Vine and Wine and the National Viticulture Institute (Argentina). The others four compounds (vanillin and hydroxycinnamic acids as ferulic, *p*-coumaric and caffeic acids) and their doses were selected due to their natural character and because they show some antimicrobial activities previously demonstrated in different works (Martorell et al., 2007).

Table 2

Fitted parameters *A* (maximum yeast Gr obtained), *r* (maximum rate of change) and *c* (preservative concentration above which growth reduction begins) obtained from the reparameterized Gompertz equation for the different chemical preservatives assayed. Standard deviations are shown in parentheses.

Preservative (mM)	<i>A</i> (%) ^a	<i>r</i> (mM ⁻¹)	<i>c</i> (mM)
DMDC	38.93 (1.61)a	190.950 (65.790)a	0.106 (0.045)a
Sodium benzoate	35.77 (1.88)a	11.190 (3.110)b	1.180 (0.235)a,b
Potassium sorbate	39.08 (1.54)a	32.250 (19.680)b	0.602 (0.190)a
Ferulic acid	29.45 (2.89)b	3.586 (0.910)b	1.23 (1.18)a,b
Caffeic acid	16.49 (6.40)c	0.595 (0.049)b	6.67 (3.11)c
Vanillin	39.98 (1.69)a	2.813 (0.136)b	1.87 (1.72)a,b
<i>p</i> -coumaric acid	14.86 (1.97)c	2.205 (1.689)b	4.95 (4.31)b,c

^a Values followed by different letters are significantly different according to a Fisher-LSD post-hoc comparison test.

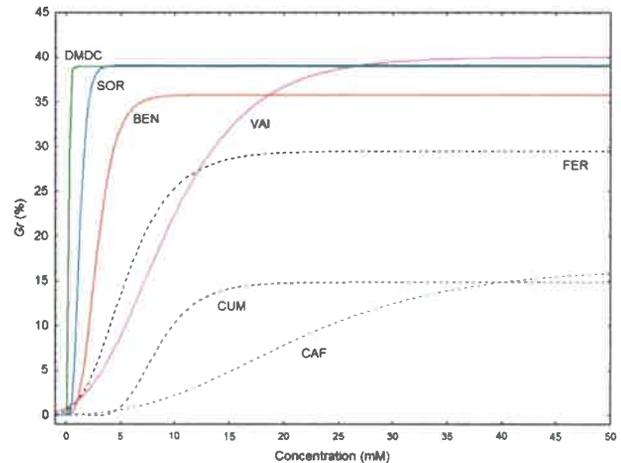


Fig. 2. Plot of the mathematical equations obtained from triplicate experiments for potassium sorbate (SOR), sodium benzoate (BEN), dimethyldicarbonate (DMDC), vanillin (VAI), ferulic (FER), *p*-coumaric (CUM) and caffeic acids (CAF) for the estimation of the growth reduction (Gr) as a function of preservative concentration.

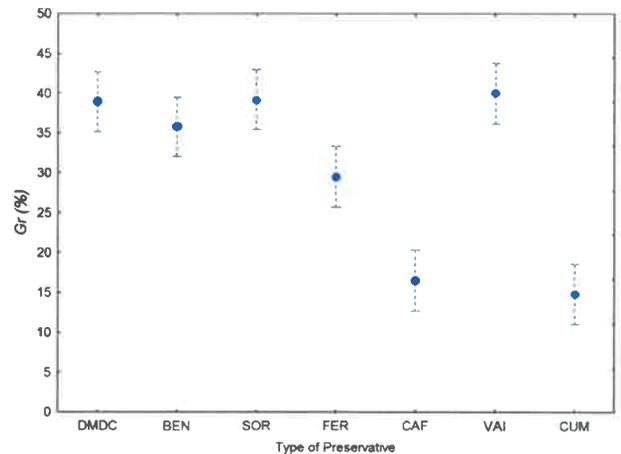


Fig. 3. One-way ANOVA analysis graphical representation of the growth reduction (Gr) obtained for *Z. rouxii* (dependent variable) as a function of the different preservatives (categorical variable). Mean values were obtained from triplicate experiments. DMDC, BEN, SOR, FER, CAF, VAI and CUM stand for dimethyldicarbonate, sodium benzoate, potassium sorbate, ferulic acid, caffeic acid, vanillin and *p*-coumaric acid, respectively.

Control of commodity spoilage by yeasts depends on the application and maintenance of conditions (during processing and storage) that either kill the cells or prevent their growth (Rojo et al., 2014). Many environmental factors (e.g., temperature, pH, *a_w*, physical matrix, etc.) determine the physical and chemical limits for survival and growth of yeasts. However the precise limits are difficult to define, since the impact of one factor may be influenced by others factors (Fleet, 2011). Concentrated grape juices represent a complex matrix where different stresses are combined (low pH and high sugar concentration). Therefore, our assay was performed in a culture medium that mimics the characteristics of the natural substrate (concentrated grape juice) in order to better extrapolate the results obtained (Praphailong & Fleet, 1997; Vermeulen et al., 2008). Yeasts rarely appear in food and beverage ecosystems as single species cultures. Exceptions occur in highly processed products where spoilage outbreaks by single and well-adapted species are known, such as *Z. rouxii* in high sugar products (Stratford, 2006). Moreover, it is widely known that the resistance level to preservatives is strain-dependent and it is also influenced

by the physiological status of the cells (Martorell et al., 2007). In this work, seven preservatives were individually assayed in a high sugar concentration culture media with low pH (4.5) using a cocktail of *Z. rouxii* strains isolated from concentrated grape juices naturally spoiled.

In contrast with previous reports, our results show that chitosan did not exhibit any antimicrobial activity against the *Z. rouxii* strain cocktail in high sugar concentration media. Even at the highest dose tested in this work (300 mg/L), which exceeds the maximum level allowed in wines (100 mg/L), no inhibition was observed.

Many organic acids preservatives such as sorbic and benzoic acids are usually added in a wide range of foods and beverages to control yeast growth. The effectiveness of these agents depends on their concentration and others food properties such as sugar concentration and pH (Fleet, 2011). The antimicrobial action of weak acid preservatives is pH-dependent, and it has been established that they are much more active in acidic environments. Low pH favours the undissociated form of the weak acid, which is membrane permeable, and consequently more toxic to the cell (Martorell et al., 2007). The hypothesis that undissociated acid molecules pass into the cell and inhibit yeast growth through acidification of the cytoplasm has been already demonstrated (Krebs, Wiggins, Stubs, Sols, & Bedoya, 1983; Stratford et al., 2013). Sorbic acid has a higher pK_a ($pK_a = 4.76$) than benzoic acid ($pK_a = 4.20$). As a result, the undissociated fraction of sorbic acid is always above that of benzoic acid. In our work medium, the undissociated form of sorbic and benzoic were 65% and 43% respectively. Albeit the maximum Gr reached with both compounds was statistically similar (39.1 vs 35.7%), a lower dose of potassium sorbate was necessary to reach the same inhibition percentage. Consequently potassium sorbate would be a more efficient inhibitor for concentrated grape juice yeasts than sodium benzoate. Similar results have been also found by Arroyo-López, Bautista-Gallego, Durán-Quintana, and Garrido-Fernández (2008) with a cocktail of table olive related yeasts.

Several resistance mechanisms to weak acids have been described in *Z. rouxii* and other related yeast species as *Z. bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* (Piper, 2011; Stratford et al. 2013). Overall, the suggested resistance mechanisms are: i) degradation and metabolism of the preservative and ii) efflux pump removing preservatives (Piper, 2011; Stratford, Plumridge, & Archer, 2007; Warth, 1977, 1988). Recently, Stratford et al. (2013) proposed that extreme resistance to weak acid preservatives in *Z. bailii* is due to population heterogeneity, with a small proportion of cells having a lower intracellular pH. This reduces the level of accumulation of any weak acid in the cytoplasm, thus conferring resistance to all weak acids but not to other inhibitors. In our work, a complete inhibition of the *Z. rouxii* cocktail by sorbic and benzoic acid was not achieved, mainly because the susceptibility to these agents varies into the same yeast species, where some strains would be more resistant than others (Fleet, 2011).

The DMDC is used as antimicrobial agent for sterilizing fermented beverages. DMDC acts by inhibiting some glycolytic enzymes particularly the alcohol dehydrogenase and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by methoxycarbonylation of the nucleophilic residues (imidazoles, amines, thiols). Moreover, its effect is not directly pH dependent (Renouf et al., 2008). The effectiveness to DMDC to inhibit the several yeast species related to grape juice and wine has been already demonstrated (Delfini et al., 2002; Renouf et al., 2008; Siricururata et al., 2013). In synthetic medium, the inhibitory activity of DMDC was yeast species and dose dependent, where 0.112 mM of DMDC were necessary to reach the complete inhibition of *Z. bailii* (Delfini et al., 2002). Moreover, *Z. bailii* isolated from syrups and candied fruit nougat were highly resistant to DMDC.

Also, the minimum inhibitory concentration (MIC) recorded for *Z. rouxii* isolated from spoiled syrups evaluated in YPD (pH 4.0) was 0.065 mM (Martorell et al., 2007). On the contrary, Costa et al. (2008) found that the DMDC MIC to *Z. bailii* isolated from spoiled wines was as low as 0.007 mM. The most promising results were obtained with a combination treatment with DMDC (0.07 mM) and natamycin (0.015 mM) in grapes juices inoculated with a cocktail of *Dekkera*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces* and *Zygosaccharomyces* species, where the extension of self-life was similar to that of the positive control (3.5 mM and 3.3 mM of sodium benzoate and potassium sorbate, respectively) (Siricururata et al., 2013). In our work, DMDC was not able to completely inhibit the growth of *Z. rouxii* cocktail in high sugar and low pH culture medium, even using higher doses than accepted. The maximum Gr obtained with DMDC was similar to sorbic and benzoic acids, in agreement with the previously mentioned works. Daudt and Ough (1980) established a semi-log correlation between the initial viable yeast population and the amount of DMDC required. When the initial viable cells increased 10-fold, an additional amount of approximately 0.04 mM of DMDC was required. In contrast, in our work, the maximum Gr was achieved with the minimal doses of DMDC assayed, and increasing doses did not produce further increase of the inhibitory effect. The hydrolysis rate of DMDC under various conditions has been studied and the half-life in the reaction with water is reported to be approximately 8 min at 30 °C, being completely hydrolysed within less than 1 h (Genth, 1979; Ough, 1983). Thus, the maximum antimicrobial effect would be expected to occur when the concentration is higher, soon after addition of the compound before degradation begins. Therefore, DMDC should not be used as preventive agent but only as curative agent against unwanted populations already presents in grape must.

Vanillin is currently used as a principle-flavouring agent and it is also a "naturally derived" promising additive for inhibiting yeasts in some fruit products. The levels added to food products such as ice cream and sweets are typically 20 and 26 mM respectively (Hocking, 1997). Previous studies have shown that certain yeasts are able to convert vanillin to its respective alcohol and acid derivate (Edlin, Narbad, Dickinson, & Lloyd, 1995). However, it has not been established if such bioconversion process could adversely affect vanillin's antimicrobial activity (Fitzgerald, Stratford & Narbad, 2003). Cerrutti and Alzamora (1996) showed that growth of *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *Z. bailii* and *Debaryomyces hansenii* was inhibited in culture media and apple pure containing 13 mM of vanillin. Additionally, vanillin was inhibitory to *Z. rouxii* and other yeasts at concentrations of 20 mM, but lower concentrations were also effective when combined with other harsher conditions such as lower temperatures and low pH (Fitzgerald, Stratford, & Narbad, 2003). Moreover, Matamoros-León, Argáiz & López-Malo (1999) have shown that inhibitory concentrations of vanillin ranged from 7.3 mM to 8.6 mM to control different *Penicillium* spp in culture media. Synergistic effects on mould inhibition when vanillin and potassium sorbate were added in combination have been also demonstrated. In our work, a wide range of vanillin concentrations was tested (2–30 mM) reaching only 40% Gr of *Z. rouxii* in a high sugar culture media for the maximum vanillin concentration assessed. In our work, the culture media conditions (390 g/L glucose + fructose and pH 4.5) represent the most favourable conditions to *Z. rouxii* development due to osmophilic character of this yeast species and these could be acting as protective conditions against preservative effect.

Hydroxycinnamic acids and their derivate are present in plants and fruits, providing a natural protection against infection by pathogenic microorganisms (Chambel, Viegas, & Sá-Correia, 1999). The use of antimicrobial active compounds naturally occurring in

grapes (e.g. HCAs and other phenols) offers scope for a new approach in juice and wine preservation. Due to the ability to inhibit growth of food spoilage bacteria as well as their relatively safe status, these compounds are increasingly becoming subject of study for their potential multipurpose use in food preservation techniques (Rodríguez Vaquero, Alberto, & Manca de Nadra, 2007). Cinnamic compounds uncouple the energy transducing cytoplasmic membrane in bacteria and this effect on the bioenergetics status of the membrane may contribute to their antimicrobial action (Mirzoeva, Grishanin, & Calder, 1997). In fact, it is expected that these compounds may lead to the stimulation of the passive influx of protons across the plasma membrane by causing the non-specific increase of the membrane permeability and consequently induce the stimulation of plasma membrane proton-ATPase activity (Sá-Correia, Salgueiro, Viegas, & Novais, 1989). Chambel et al. (1999) reported that *S. cerevisiae* cells grown at pH 4, in the presence of growth inhibitory concentrations of cinnamic acids exhibited a more active plasma membrane proton ATPase than control cells. A previous study has also found that sensitivity to HCAs depends on the organisms as well as the specific HCA under study (Campos et al., 2003). Moreover, others authors have proposed that HCAs were fungistatic rather than fungicidal against *Dekkera* spp. and the antimicrobial properties of grape phenols significantly depend on differences in their chemical structures (Harris et al., 2010). The results presented here show that ferulic acid was the most effective HCAs in preventing the growth of *Z. rouxii* under high sugar concentration and low pH media conditions. This latter is in agreement with the results reported by Harris and colaboradores (2010) who found that the minimum inhibitory concentration (MIC) for *Dekkera bruxellensis* and *Dekkera anomala* in culture media was 4 and 8 mM ferulic acid and 8 and 10 mM *p*-coumaric acid respectively. Recently, Pastorkova et al. (2013) demonstrated that *p*-coumaric and ferulic acids exhibited selective inhibitory effects on *Z. rouxii* with MICs higher or equal to 1.55 mM and 1.30 mM for *p*-coumaric and ferulic acids respectively. In contrast, caffeic acid did not show any anti-yeast or anti-bacterial activity. In our work, the maximum Gr reached by HCAs additions was about 15–30%, the MIC were not determined because total inhibition of *Z. rouxii* was not achieved at the maximal concentration of HCAs assayed.

5. Conclusions

The results obtained in this work show the great resistance of *Z. rouxii* to all chemical preservatives assayed in a high sugar culture media. Only a maximum Gr around 40% was obtained for DMDC, sodium benzoate, potassium sorbate and vanillin, while caffeic and *p*-coumaric acid had the lowest inhibitory effect (around 15%). Further research should be performed to estimate the combined effect of the highest inhibitory compounds to achieve complete *Z. rouxii* inhibition.

Acknowledgements

This research was supported by the Technological Project MZASJ1007: Support for Regional Viticulture Development – INTA. The authors wish to kindly thank to Dra. Amparo Querol (IATA-CSIC) for her generous scientific advice. M.C. Rojo is a Doctoral student Fellow of CONICET. F.N. Arroyo-López wants to thank CSIC and Spanish government for his Ramón y Cajal post-doctoral research contract.

References

Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Durán-Quintana, M. C., & Garrido-Fernández, A. (2008). Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives. *Food Microbiology*, 25, 566–574.

Bautista Gallego, J., Romero Gil, V., Garrido Fernández, A., & Arroyo López, F. N. (2012). Modeling the inhibitory effect of zinc chloride on table olive related yeasts. *Food Control*, 23, 499–505.

Beuchat, L. R. (1982). Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *Journal of Food Science*, 47, 1679–1682.

Campos, F. M., Couto, J. A., & Hogg, T. A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 167–174.

Cerrutti, P., & Alzamora, S. M. (1996). Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 379–386.

Chambel, A., Viegas, C. A., & Sá-Correia, I. (1999). Effect of cinnamic acid on the growth and on plasma membrane H⁺ – ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 173–179.

Combin, M., Daguette, C., Massera, A., Mercado, L., Sturm, M. E., Ganga, A., et al. (2008). Yeasts identification in with grape juice concentrates from Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 192–197.

Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25, 422–427.

Cuppers, H. G. A. M., & Smelt, J. P. P. M. (1993). Time to turbidity measurement as a tool for modeling spoilage by *Lactobacillus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 168–171.

Daudt, C. E., & Ough, C. S. (1980). Action of dimethyl dicarbonate on various yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31(1), 21–23.

Deak, T., & Beuchat, L. R. (1994). Use of indirect conductimetry to predict the growth of spoilage yeasts, with special consideration of *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 405–417.

Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., & Ambró, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5605–5611.

Edlin, D. A. N., Narbad, A., Dickinson, R. J., & Lloyd, D. (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters*, 125, 311–316.

Fitzgerald, D. J., Stratfors, M., & Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 113–122.

Flanzy, C. (Ed.). (2000). *Tablas de composición, In: Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (pp. 218–226). Madrid: AMV ediciones.

Fleet, G. H. (2011). Yeast spoilage of foods and beverages. In *The yeasts, a taxonomic study*, 5 pp. 53–63.

García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E. M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Alvarez, P. J., et al. (2012). Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic bacteria growth. *Food Control*, 28, 212–219.

Genth, H. (1979). Dimethyl dicarbonate – ein neuer verschwindestoff für alkoholfreie, fruchtsafthaltige erfrischungsgetranke. *Erfrisch getränk Miner wasser Ztg*, 13, 262–269.

Grimbaum, A., Ashkenazi, I., Treister, G., Goldschmied-Reouven, A., & Block, C. S. (1994). Exploding bottles: eye injury due to yeast fermentation of an uncarbonated soft drink. *British Journal of Ophthalmology*, 78, 883.

Harris, V., Jiraneek, V., Ford, C. M., & Grbin, P. R. (2010). Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 721–729.

Hidalgo Togores, J. (2002). *Tratado de enología, I*. Editorial Grupo Mundi Prensa.

Hocking, M. B. (1997). Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *Journal. Chemical Education*, 74, 1055–1059.

Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubs, M., Sols, A., & Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*, 214, 657–663.

López-Malo, A., Alzamora, S. M., & Argaiz, A. (1995). Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems. *Food Microbiology*, 14, 117–124.

López-Malo, A., Alzamora, S. M., & Argaiz, A. (1998). Vanillin and pH synergistic effects on mould growth. *Journal of Food Science*, 63, 143–146.

Marechal, P. A., Martinez de Marnanon, I., Poirier, I., & Gervais, P. (1999). The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 15–20.

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 234–242.

Matamoros-León, B., Argaiz, A., & López-Malo, A. (1999). Individual and combined effects of vanillin and potassium sorbate on *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum*, and *Penicillium italicum* growth. *Journal of Food Protection*, 62, 540–542.

Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and mobility of bacteria. *Microbiological Research*, 152, 239–246.

Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V.). (2013). *Code of oenological practices* (pp. 1–318). Paris: OIV Editions.

Ough, C. S. (1983). Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate. In A. L. Branen, & P. M. Davidson (Eds.), *Antimicrobials in foods* (pp. 299–325). New York, NY: Marcel Dekker.

Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261–1269.

- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J., & Kokoska, L. (2013). Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 209–213.
- Piper, P. (2011). Resistance of yeasts to weak organic acid food preservatives. *Advances in Applied Microbiology*, 77, 97–110.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pozo-Bayón, M.Á., Monagas, M., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 31–54.
- Praphailong, W., & Fleet, G. H. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14, 459–468.
- Ravn, H., Andary, C., Kovacs, G., & Moelgaard, O. (1989). Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17, 175–184.
- Renouf, V., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Effectiveness of dimethyl dicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19, 208–216.
- Rodríguez Vaquero, M. J., Alberto, M. R., & Manca de Nadra, M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18, 93–101.
- Rojo, M. C., Arroyo López, F. N., Lerena, M. C., Mercado, L., Torres, A., & Combina. (2014). Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiology*, 38, 143–153.
- Sá-Correia, I., Salgueiro, S. P., Viegas, C. A., & Novais, J. M. (1989). Leakage induced by ethanol and octanoic and decanoic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 5(Suppl.), S123–S127.
- Siricururata, P., Iyer, M. M., Manns, D. C., Churey, J. J., Worobo, R. W., & Padilla-Zakour, O. (2013). Shelf-life evaluation of natural antimicrobials for Concord and Niagara grape juices. *Journal of Food Protection*, 1, 72–78.
- Smid, E. J., & Gorris, L. G. M. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. In M. S. Rahman (Ed.), *Handbook of food preservation* (pp. 285–308). New York: CRC.
- Stead, D. (1993). The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 135–141.
- Stratford, M. (2006). Food and beverage spoilage yeast. In A. Querol, & G. Fleet (Eds.), *Yeast in food and beverages: Vol. 2. The yeast handbook* (pp. 335–379). Germany: Springer-Verlag.
- Stratford, M., Plumridge, A., & Archer, D. B. (2007). Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the PAD1 gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6534–6542.
- Stratford, M., Steels, H., Nebe-Von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., & Archer, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 126–134.
- Van Sumere, C. F., Cottenie, J., De Gref, J., & Kint, J. (1971). Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. *Recent Advances in Phytochemistry*, 4, 165–221.
- Vermeulen, A., Dang, T. D. T., Geeraerd, A. H., Bernaerts, K., Debevere, J., Van Impe, J., et al. (2008). Modelling the unexpected effect of acetic and lactic acid in combination with pH and aw on the growth/no growth interface *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 79–90.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Halligan, K. M., Stermitz, F. R., & Vivanco, J. M. (2003). Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2548–2554.
- Warth, A. D. (1977). Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 215–230.
- Warth, A. D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2091–2095.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875–1881.

96