

# Inactivación de Microorganismos por Altas Presiones en la Industria Vinícola

Jaime Nelson Montaña B\*, Sandra Patricia Ortegón T\*.

## RESUMEN

Con el fin de evaluar experimentalmente la capacidad de los gases CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> bajo presión para inactivar levaduras salvajes, mostos de uva del Viñedo y Cava de Puntalarga (Nobsa, Boyacá), estos se sometieron a tratamientos hiperbáricos con los mencionados gases. El CO<sub>2</sub> a 15°C y presiones entre 1 y 5 MPa alcanzó altos porcentajes de inactivación de células de levadura (>90%) al final del proceso de pascalización (después de 2 horas). Contrario al tratamiento con CO<sub>2</sub>, el uso de N<sub>2</sub> a 15°C falló para ejercer un efecto microbicida a 4 y 10 MPa durante un tiempo igual de proceso. Mientras el CO<sub>2</sub> de alta solubilidad en H<sub>2</sub>O tiene el potencial para reducir cargas microbianas en mostos; el N<sub>2</sub> de baja solubilidad en H<sub>2</sub>O, no tiene efecto significativo sobre la supervivencia de microorganismos patógenos en dicho jugo.

**Abstract:** In order to evaluate experimentally the capacity of N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> under pressure to inactivate wild yeasts which remain in the Puntalarga Vineyard grape musts were exposed to hiperbaric treatment with these gases. At the end of the pascalization ( after 2 hours), CO<sub>2</sub> at 15°C under pressures from 1 to 5 MPa, reached high inactivation percentages of yeast cells (> 90%). Contrary to CO<sub>2</sub> treatment the use of N<sub>2</sub> at 15°C at 4 and 10 MPa failed to exert microbicide effect in a same treatment time. While CO<sub>2</sub> gas with high solubility in water has the potential to reduce microbial loads in musts, N<sub>2</sub> gas with low solubility in water have not effect on the survival of the pathogenic microorganisms in these juices.

**Keywords:** High pressure, pascalization, inactivation, yeast.

## INTRODUCCIÓN

La esterilización con calor es el método más tradicional y popular para prevenir, la contaminación microbiana en los alimentos. Este proceso, sin embargo, puede frecuentemente causar cambios indeseables en la calidad de los productos, tales como descomposición de los nutrientes, pérdida del sabor y deterioro del color y textura causados por las altas temperaturas. Aunque agentes antimicrobianos son también usados para la

preservación de alimentos, ellos no siempre ejercen efectos microbicidas óptimos.

En los últimos años, la tecnología de la alta presión es propuesta como sistema de estabilización microbiológica de productos alimenticios como alternativa a las técnicas tradicionales, respecto a las cuales es mayor el grado de preservación de las características naturales y organolépticas de los alimentos.

Actualmente, hay sugerencias para que el proceso de estabilización con presión sea llamado **pascalización**, así como el procesamiento con calor es llamado pasteurización.

El efecto del tratamiento de alta presión, sobre microorganismos fue estudiado por primera vez por Hite [9] en 1899. En 1951, Fraser D[4], fue el primero en reportar, rompimiento de células microbianas con una rápida liberación de gas bajo moderadas condiciones (menos de 4 MPa), posteriormente la técnica fue desarrollada. En 1994, Nakamura K. et al [24] sugirieron que la disminución en la supervivencia de células podría estar altamente correlacionada con la absorción y desorción de gas por las células; lo cual causaría fractura mecánica y/o daño fisiológico en ellas. Una afirmación similar ha sido independientemente demostrada por otros investigadores (Fraser D. *et al.*, 1951; Foster J. W. *et al.* 1962; Kamihira M. *et al* [13], 1987., Haas, G. J. *et al* [6], 1987, Castor, T.P. *et al.*, 1991; Lin, H.M. *et al.*, 1991 [16], 1992 [17]), usando varias clases de gases (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, Ar) y microorganismos (*S. Cerevisiae*, *E. Coli*, *S. Marcescens*, *S. Aureus*, *B. Abortus*, *E. Tenella*, *B. Subtilis* etc.).

Sin embargo, el mecanismo general para la esterilización por esta técnica no ha sido todavía clarificado, pero existen posibilidades desde que hay absorción de gas por parte de la célula.

Las primeras pruebas de estabilización con alta presión que se han hecho sobre una bebida alcohólica se realizaron sobre una bebida japonesa obtenida del arroz, el Sake [7], el tratamiento permitió inactivar lactobacilos y levaduras presentes en esta bebida. En 1994, Moio, L. *et al* [22] lograron

\*Ingenieros Químicos Universidad de América. Santafé de Bogotá. Colombia.

disminuir cargas microbianas de mohos y levaduras presentes en mostos de uva por medio de tratamiento hiperbárico - hidrostático.

Durante los pasados 10 años el estudio de esta técnica de estabilización ha despertado el interés de diferentes grupos de investigación de las universidades de Kyoto (R. Hayashi), Berlin (D. Knorr), Montpellier (J. C. Cheftel) y la Stazione Sperimentale per L'Industria delle Conserve Alimentari, Italia (G. Dall'Aglio).

Teóricamente el CO<sub>2</sub> bajo presiones apropiadas, puede ser un candidato promisorio para el control racional de microorganismos indeseables en mostos de uva para vinificación [28]. El perfeccionamiento de esta técnica sería atractivo para reducir los niveles de SO<sub>2</sub> o para un mejor manejo de la fermentación semicontinua del tipo Fed-Batch [28].

El objetivo de este estudio fue evaluar experimentalmente la capacidad de los gases, N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a alta presión para inactivar microorganismos patógenos presentes en mostos de uva del Viñedo y Cava de la Loma de Puntalarga (Nobsa, Boyacá). El estudio se enfocó sobre los parámetros de presión y tiempo de tratamiento.

## I. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MOSTOS DE UVA Y MICROORGANISMOS.

Se utilizó el zumo de uvas sembradas en la Loma de Puntalarga en Nobsa, Boyacá. Una vez estrujada la uva y retirados los hollejos, el jugo fue clarificado.

En este zumo se encuentran presentes levaduras indeseables, entre las que se destacan los géneros *Pichia*, *Hansenula* y *Candida*; capaces de desarrollarse en el hollejo al principio y, con el correr de la fermentación, en la superficie del vino. Éstas son las causantes de los velos que se forman en la superficie de los vinos o en las paredes empapadas de vino y en contacto con el aire.

### B. EQUIPO DE ALTA PRESIÓN

Se construyó un sistema presurizable a nivel de laboratorio, cuyo diseño se basó principalmente en los conceptos presentados en el código ASME VIII. *Boiling and Pressure Vessels Code*.

El recipiente sometido a presión, es un autoclave, constituido por un tubo cilíndrico en acero al carbón SA-53 Grado B, de diámetro 76 mm, con una longitud de 350 mm y, un espesor de 10 mm, para una presión de diseño de 20 MPa; está soldado en su parte inferior a la tapa del mismo material, la cual tiene un espesor de 13 mm. La tapa superior es desmontable, y está elaborada en acero inoxidable 316.

Con el fin de instalar el manómetro, se construyó una pieza

hueca cilíndrica en acero inoxidable (buje) que va roscada atravesando el espesor de la tapa superior, esta pieza tiene 5 mm de espesor de pared y 15 mm de espesor en la parte superior; en ella, también se encuentra compartiendo el eje de simetría, la línea que permite la entrada de gas y la salida del líquido; ésta va hasta el fondo y es desmontable. Se eligió para la tapa superior un cierre de abrazadera en "V".

Los accesorios que estuvieron en contacto con el mosto se adquirieron en acero inoxidable 316, que están diseñados para soportar alta presión hasta un límite de 34,5 MPa, éstos son:

- Un recipiente contenedor del líquido, con las medidas internas del cuerpo cilíndrico del autoclave, recubriéndolo totalmente de tal manera que aísla el líquido y no permite contaminación por contacto con acero al carbón; este recipiente no soporta ningún tipo de esfuerzo en el momento de presurizar el autoclave.
- La tubería de 6,35 mm de diámetro y 3 m de longitud.
- Para ejercer un control manual, sobre los flujos de gas y de líquido, se emplearon válvulas de aguja de 6,35 mm de diámetro.
- Tapones y uniones "T", para sellar y conectar tramos de tubería de 6,35 mm de diámetro, respectivamente.

Elementos en otros materiales son el medidor de presión, con carátula de 50,8 mm y rango 0-10 MPa y los conectores al cilindro de gas y el codo donde se encuentra roscado el manómetro, se adquirieron en bronce. Para la válvula de alivio se estableció un lugar en el montaje en la rosca lateral de la "T" ubicada en la parte superior de la tapa. Según el código ASME VIII, se recomienda un *Set-Pressure* para esta válvula del 10% sobre la máxima presión de operación.

### C. VARIABLES Y SUS NIVELES

En este estudio se midió el efecto de las variables presión y tiempo de tratamiento, sobre la supervivencia de las células de levadura.

Se consideró como valor máximo de presurización, la presión de vapor del CO<sub>2</sub> a 15°C (5 MPa), a partir de ahí se consideraron disminuciones de 1 MPa; alcanzando 5 niveles.

En el caso del nitrógeno, gracias a que durante el desarrollo de la investigación se mantuvo una constante recopilación de información, fue posible vislumbrar que el efecto inactivante del nitrógeno sobre microorganismos es nulo, esto apoyándose en los reportes de Nakamura K. *et al* [24], R. E. [19],[20], Wei, C. I. *et al* [36] Por tal razón, con este gas sólo se llevó a cabo dos corridas de presión; 4 y 10 MPa, las cuales aportan información suficiente para sustentar esta afirmación.

Tanto para el CO<sub>2</sub> como para el N<sub>2</sub>, la variable tiempo, toma un valor máximo de 2 horas, a partir de ahí se asumieron valores distantes uno de otro 15 minutos hasta tiempo cero, alcanzando entonces 9 niveles.

**D. MÉTODO DE PRESURIZACIÓN**

Debido a que el tratamiento a presión surge como una alternativa de esterilización a bajas temperaturas, se trabajó a 15°C, temperatura del lugar de experimentación.

El jugo de uva ya clarificado se deposita en el interior del autoclave, el cual se cierra herméticamente. Antes de iniciar el tratamiento se optó por la saturación del mosto con gas (CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub> dependiendo de la situación), provocándose un burbujeo en el seno del líquido que permitió un contacto total de las dos fases durante 15 minutos y, la posterior eliminación del aire, limitando el tratamiento a condiciones anaerobias. Este procedimiento fue realizado por Inseschmid, A. *et al* [10].

Para saturar el líquido con el gas (figura 1) es necesario abrir la válvula 1 y lentamente la válvula 2, manteniendo cerradas las válvulas 3 y 4; el gas entra por la línea 7 burbujeando en el líquido. Al mismo tiempo el tapón de la línea 6 es removido, con el fin de permitir la salida del aire que va siendo desplazado por el gas. Este procedimiento se llevó a cabo durante 15 minutos para todas las corridas de presión.

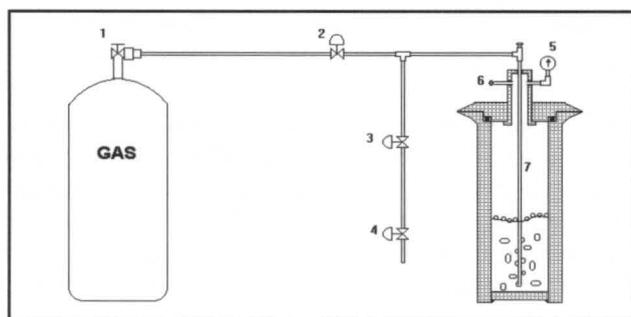


Figura 1. Método de presurización.

Una vez lograda la saturación del líquido con el gas se tapona la línea 6; cuando se observa la presión deseada en el manómetro (5), se cierra la válvula (2) para mantener la presión en el interior del autoclave, considerando a partir de este momento los primeros 15 minutos.

Para la toma de muestras se aprovecha la sobrepresión existente en el autoclave, empujando por medio de esta el líquido a través de la línea 7. Posteriormente se da utilidad a la trampa de presión (adoptada para evitar muerte celular por descompresión súbita). Al abrir la válvula 3, el líquido ocupa el tramo de línea entre válvula y válvula, cerrándola se mantiene el líquido atrapado. Para extraer la muestra se abre la válvula 4, permitiendo que el líquido salga de manera continua y suave.

Para cada corrida de presión fue necesario una toma de 9 muestras cada una de 20 ml. Estas alícuotas se recogieron en un *beaker*. Una vez alcanzada una dilución de  $1 \times 10^{-2}$ , se sembró 1 ml de ésta en la placa *Petrifilm*<sup>TM</sup> *3M*<sup>TM</sup>. En el transcurso de 3 a 5 días los resultados se manifiestan a temperatura ambiente.

Entre cada corrida de presión, el sistema fue limpiado con agua destilada esterilizada.

**E. MEDICIÓN DEL EFECTO DE INACTIVACIÓN**

En este estudio se denominó inactivación al efecto inhibitorio de gases comprimidos sobre el crecimiento microbiano, el cual fue estimado por medio del conteo de células vivas después de cada tratamiento. Para esto, se recurrió a un moderno y práctico método de cultivo e interpretación, compuesto por placas *Petrifilm*<sup>TM</sup> *3M*<sup>TM</sup> las cuales presentan ventajas importantes como: fácil conteo de levaduras, no requiere preparación de medios de cultivo porque ya están incluidas en ellas y, no requieren conocimientos profundos en microbiología para su utilización y entendimiento.

Consecuentemente, era interesante desarrollar un método de predicción, es decir, un procedimiento para determinar el porcentaje de células vivas de levadura para varios niveles de presión y tiempo tomados de información experimental. El aspecto estadístico del problema consistía entonces en lograr la mejor estimación de la relación entre las variables.

Entre los muchos paquetes de computador de alta velocidad disponibles para regresión múltiple, se utilizó el *Statgraphics*, el cual además de imprimir estimaciones de los coeficientes de regresión, también proporciona información relevante para la realización de inferencias relativas a la ecuación de regresión.

**II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En los cuadros 1 y 2 se pueden observar los datos obtenidos en el conteo de microorganismos (definidos como unidades formadoras de colonias UFC/ml) con CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> presurizados respectivamente.

Los resultados confirman las expectativas creadas alrededor de este estudio; la capacidad del CO<sub>2</sub> presurizado para inactivar levaduras patógenas presentes en mostos de uva y, el inofensivo efecto del N<sub>2</sub> presurizado sobre la viabilidad de dichos microorganismos.

Cuadro 1. Conteo de microorganismos con CO<sub>2</sub> presurizado en UFC/ml.

Presión, MPa	1	2	3	4	5
Tiempo, min.					
0'	2,4x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>
15	1,5x10 <sup>3</sup>	9,3x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>
30	1,3x10 <sup>3</sup>	8,9x10 <sup>3</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	8,1x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>
45	1,2x10 <sup>3</sup>	5,3x10 <sup>3</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	5,7x10 <sup>4</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>
60	1,0x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>
75	4,6x10 <sup>2</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>
90	2,6x10 <sup>2</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>
105	1,8x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	6,4x10 <sup>3</sup>	3,3x10 <sup>4</sup>	5,7x10 <sup>3</sup>
120	1,4x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>3</sup>

Inseschmid, A. *et al* [10], reportaron que el mecanismo de inactivación se debe más a un "efecto anestésico", que a una ruptura celular. El CO<sub>2</sub> tiene algunas propiedades únicas en su género, tales como su lipo e hidrofiliidad. Esta es la razón por la que el CO<sub>2</sub> se difunde así fácilmente a través, y dentro, de la membrana plasmática de microorganismos, que permite luego "expirar" el CO<sub>2</sub> producido. Una rápida difusión dentro de la célula puede también ocurrir. El CO<sub>2</sub> molecular puede

igualmente difundirse dentro de la membrana celular y acomodarse allí desde que la capa interior es lipofílica. La fluidez de tal membrana se incrementa debido al efecto perturbador de las moléculas extrañas y la pérdida de cadenas de lípidos (“efecto anestésico”). Con la fluidez la permeabilidad se incrementa, las características de fusión de la membrana se alteran y ocurre desestructuración de membrana esencial imperante. [15,22,27]

Insenchmid, A. *et al* [10], obtuvieron resultados en los que aproximadamente el 25% de las células mostraron membranas plasmáticas intactas (no encogimiento, y no agregación de proteínas complejas), mientras la viabilidad es tan baja como 2,2%. Esto sugirió que células que tienen aparentemente membranas intactas tienen menor su viabilidad. Así se mostró que la inactivación celular no está necesariamente acompañada de lisis celular.

Kamihira, M. *et al* [13], esterilizaron células de levadura y otros microorganismos con CO<sub>2</sub> a 20,5 MPa y 35°C, cuando el contenido de agua fue alrededor del 70-90%. Sin embargo, células secas con un contenido de agua de 2-10% no pudieron ser esterilizadas bajo iguales condiciones. Los resultados de estos investigadores sugieren que la solubilidad del gas en agua fue un factor primario que influyó la inactivación de los microorganismos. Es así, como en este estudio mientras nitrógeno con baja solubilidad en agua falló para inactivar levaduras en mostos de uva, todo lo contrario sucedió con CO<sub>2</sub> de alta solubilidad en agua.

Cuadro 2. Conteo de microorganismos con N<sub>2</sub> presurizado UFC/ml.

Presión (MPa) \ Tiempo (min)	4	10
0	7,3x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>
15	7,1x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>
30	6,8x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>
45	7,0x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>
60	7,2x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>
75	7,2x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>
90	6,9x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>
105	6,4x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>
120	7,0x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>

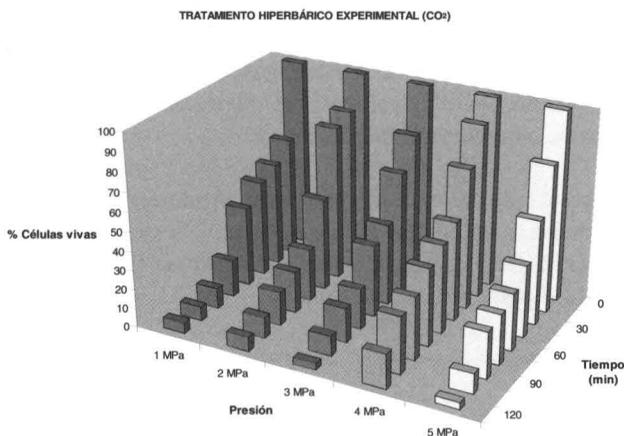


Figura 2. Tratamiento hiperbárico experimental con CO<sub>2</sub>.

Los datos experimentales disponibles en la literatura consultada para la solubilidad del CO<sub>2</sub> y el N<sub>2</sub> en agua, se sometieron a un análisis de regresión con el fin de obtener una aproximación lo más cerca posible a la realidad de este estudio. Las figuras 3 y 4 se elaboraron a partir de los modelos de regresión generados.

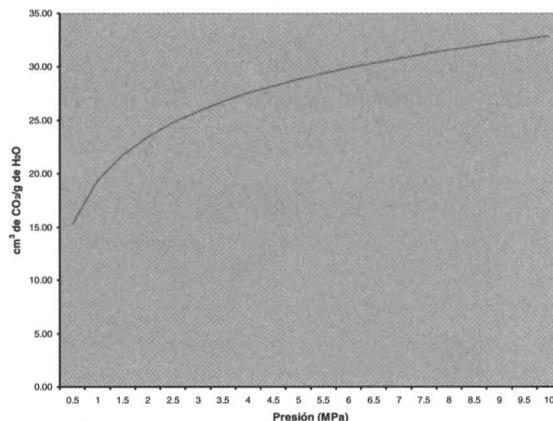


Figura 3. Solubilidad del CO<sub>2</sub> en agua a 18°C. [26]

Kumagai, H. *et al* [14] determinaron la relación existente entre la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por el sistema célula - agua y el contenido de agua, utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*. Ellos encontraron que la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido tiende a incrementarse con el aumento del contenido de agua. Así, mientras que para un contenido de agua de 0,5 g/g de materia seca, la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por las células de levadura es de 0,015 g de CO<sub>2</sub>/g de muestra a 40°C y 4MPa, para una cantidad de agua de 1 g/g de materia seca, la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido es de 0,02 g de CO<sub>2</sub>/g de muestra bajo iguales condiciones de temperatura y presión.

Los resultados de estos investigadores, también muestran que la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido se incrementa con el aumento de la presión del CO<sub>2</sub> a un contenido de agua idéntico. Así, para un contenido de agua de 1 g/g de materia seca a 40°C, la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por las células es de 0,045 y 0,07 g de CO<sub>2</sub>/g de muestra, para presiones de 6 y 10 MPa, respectivamente.

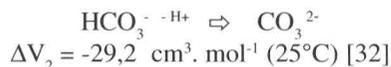
A su vez, Kumagai, H. *et al* [14] encontraron que a mayor cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por el sistema célula - agua, mayor es la constante de esterilización utilizando esta técnica. Por lo tanto, al ser el CO<sub>2</sub> soluble en agua, la misma presente en el sistema podría aumentar la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por las células, resultando en un alto efecto letal.

Los gases que son solubles generalmente reaccionan químicamente con el disolvente; este parece ser el caso del CO<sub>2</sub>, basándose en la hipótesis que alta presión de CO<sub>2</sub> disuelto en agua produce ácido carbónico, causando una disminución del pH.

El ácido carbónico responde a la presión por incrementada ionización sugiriendo también formación de enlace covalente entre el agua y el CO<sub>2</sub>[32].



$$\Delta V_1 = -26,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} (25^\circ\text{C}) [32]$$



La ionización del agua es promovida por la presión. El volumen de ionización del agua e iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{OH}^-$  a  $25^\circ\text{C}$  es  $-22,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  [32].

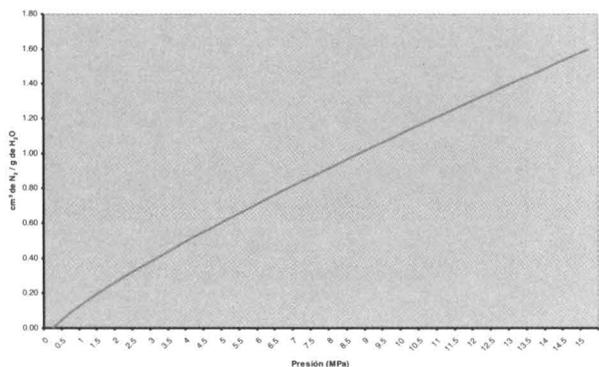


Figura 4. Solubilidad del  $\text{N}_2$  en agua a  $25^\circ\text{C}$  [18].

Jones, R. P. y Greenfield, P. F.[11] y Thibault J.[34], reportaron que el  $\text{CO}_2$  disuelto y el  $\text{HCO}_3^-$  acuoso tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células para un extenso rango de especies microbianas. El agua en contacto con  $\text{CO}_2$  bajo presión es rica en ácido carbónico y puede fácilmente alcanzar niveles de acidez, los cuales podrían desactivar al menos una enzima fuerte, como lo afirmaron Steytler, D.C. *et al* [31].

Sin embargo, Wei, C.I. *et al* [36] adicionaron 0,1 N de HCl para decrecer el pH en varios modelos de alimentos, pero la reducción del número de microorganismos falló; resultados similares obtuvo Insenschmid, A.[10] El efecto de esterilización así se manifiesta debido a la acción combinada del tratamiento de alta presión y bajo pH por el uso del  $\text{CO}_2$  como lo reportó Haas, G. J. *et al* [6].

Podría ser también que mucho del  $\text{CO}_2$  molecular pase a través de la membrana y baje el pH interno por exceso de la capacidad amortiguadora de la piscina celular. El bicarbonato formado, que es un ácido débil, podría desarreglar el balance ácido-base de células; interfiriendo en el metabolismo celular, como lo afirmaron los investigadores Marquis R. E [19], Jones R. P. and Greenfield P. [12] y Oura *et al*[25]

Por el contrario, el nitrógeno de baja solubilidad en agua, no influencia cambios de pH y no reacciona químicamente.

La cinética de inactivación de levaduras por tratamiento con  $\text{CO}_2$  a los 5 valores de presión adoptados se aprecia en la figura 5.

La marcha de la curva indica que el número de células de levadura, disminuye linealmente al aumentar la duración de los tratamientos, a todos los valores de presión considerados. Mientras cerca del 20% de levaduras fueron inactivadas a 3 MPa y 15 minutos de tratamiento, el 96% de levaduras fueron inactivadas a 120 minutos a esta misma presión.

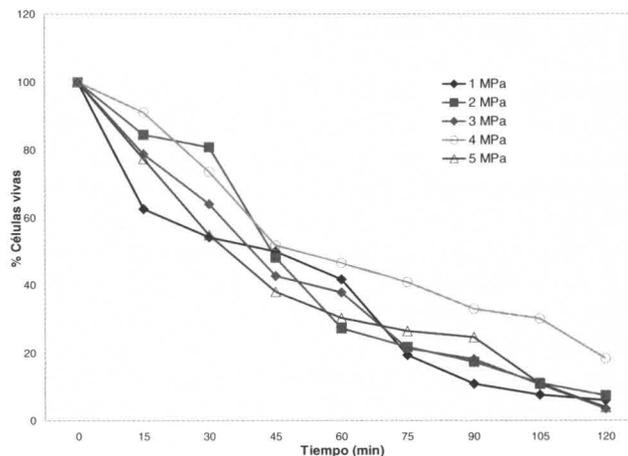


Figura 5. Cinética de inactivación de células de levadura con  $\text{CO}_2$  presurizado

Contrario a lo esperado el efecto de inactivación no aumentó a presiones mayores; después de 30 minutos de tratamiento, 1 MPa y 5 MPa tienen el mismo efecto, cerca del 45% de las células han sido inactivadas. Con excepción del tratamiento a 4 MPa, las demás presiones a 120 minutos hicieron más evidente esta afirmación; ya que, porcentajes de inactivación similares se observaron para 1, 2, 3 y 5 MPa (> 90%). Los resultados sugieren que la diferencia en el contenido inicial de microorganismos presentes en las muestras fue un factor que influyó la efectividad de la inactivación. Es así, como la muestra inicial (tiempo cero) para 4 MPa tiene la mayor carga microbiológica y un porcentaje de inactivación de 81,8% a un tiempo de 120 minutos; mientras que, la muestra inicial para 1 MPa tiene la menor carga microbiológica, y un 94,2% de inactivación a igual tiempo de tratamiento.

Otra posible explicación a este fenómeno fue analizada por Moio L. *et al* [23], quienes afirmaron que el grado de turbidez (sólidos en suspensión) y el contenido azucarado de los mostos pueden influenciar la efectividad del tratamiento, ejerciendo un carácter protector sobre las células de levadura; este último factor, parece ser el mayor responsable de la disminución en el efecto de inactivación microbiana.

En este caso, las muestras para cada corrida de presión tenían diferencias en los contenidos de azúcar iniciales, como se puede ver en el cuadro 3, teniendo validez la afirmación de Moio, L. *et al.*, [23] para este estudio.

Cuadro 3. Contenido inicial de azúcar en las muestras.

MUESTRA	1 MPa	2 MPa	3 MPa	4 MPa	5 MPa
* BRIX	12	14	14	16,5	15,8

Según los resultados de Moio, L. *et al* [23], cuanto más alta sea la presión de CO<sub>2</sub> y más bajo el contenido azucarado, tanto más rápida será la inactivación.

#### ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

Se tiene una sola variable dependiente o respuesta, la cual no se controla en el experimento; definida como el porcentaje de células de levadura vivas. Esta respuesta depende de dos variables independientes, estas son: Presión (MPa) y tiempo (minutos). Para estimar la variable respuesta se propuso un modelo de regresión múltiple:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \beta_{11} x_{1i}^2 + \beta_{22} x_{2i}^2 + \beta_{12} x_{1i} x_{2i} + E(e_i)$$

La ecuación de regresión estimada a partir de los datos arrojados por el paquete *Statgraphics*:

$$y = 84,060202 + 1,096444 x_1 - 1,339631 x_2 - 0,016222 x_1^2 + 0,00493 x_2^2$$

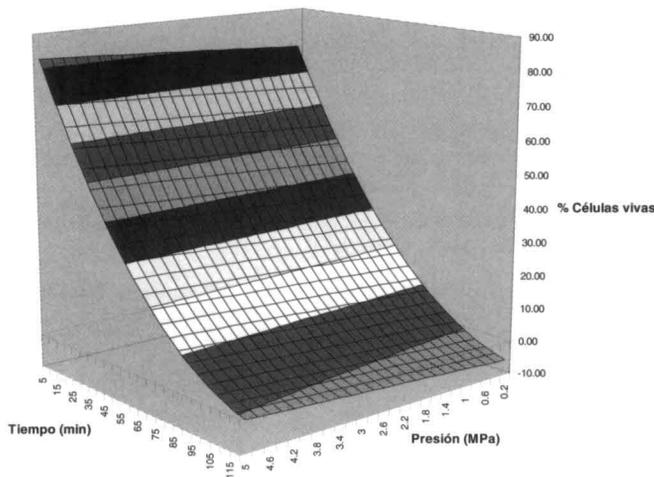


Figura 6. Superficie de regresión.

El coeficiente de determinación múltiple para esa ecuación indica que el 95% de la variación total del porcentaje de células vivas se explica o contabiliza mediante el modelo postulado. Éste descarta la importancia de la interacción que implicaba que el efecto producido por el cambio de una variable (ej.  $x_1$  presión) dependía del nivel de la otra variable ( $x_2$  tiempo). En la figura 6 se puede apreciar la superficie de regresión generada por este modelo.

#### CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que CO<sub>2</sub> a alta presión tiene el potencial para reducir cargas microbianas (levaduras salvajes) a temperatura ambiente, mientras que el N<sub>2</sub> no tiene efectos significativos sobre la supervivencia de estos microorganismos a igual temperatura. El factor primario que

influenció la inactivación fue la solubilidad del gas en agua; siendo ésta alta para el CO<sub>2</sub> y muy baja para el nitrógeno. Por lo tanto, el agua presente en el sistema podría aumentar la cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por las células resultando en un alto efecto letal. Sin embargo, la relación entre el CO<sub>2</sub> absorbido y el efecto de inactivación, necesita ser investigado para elucidar el mecanismo de esterilización con CO<sub>2</sub> presurizado.

La magnitud de la presión no influenció cambios considerables en la eficiencia del tratamiento hiperbárico; ésto probablemente debido a las diferencias entre las cargas microbianas y los contenidos de azúcar iniciales de las muestras, para cada corrida de presión; éste último factor, parece ejercer un carácter protector sobre las células de levadura. Por tal razón, las condiciones óptimas bajo los límites de este estudio, estuvieron dadas por la variable tiempo.

Alta presión de CO<sub>2</sub> a temperatura ambiente (condiciones subcríticas), permite alcanzar buenos porcentajes de inactivación (> 90%) después de 2 horas de tratamiento; estos resultados pueden ser útiles para el establecimiento de un simple, seguro y no costoso método de esterilización para materiales termosensitivos.

Se ha demostrado la validez de las altas presiones como sistema de estabilización microbiológica de mostos de uva destinados a la fermentación con levaduras seleccionadas. En enología la pascalización tiene ventajas importantes como: reducir la dosis de SO<sub>2</sub>, limitar el daño térmico a cargo de algunos componentes aromáticos del mosto y del vino debido al tratamiento de estabilización con calor y, reducir el número de filtraciones a las cuales es sometido el vino con el fin de buscar estabilidad microbiológica.

El interés general en presurización para procesamiento de alimentos promete una nueva era de investigación y tecnología de presión aplicada.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. AMERICAN SOCIETY OF MECHANICAL ENGINEERS. ASME VIII, Boiler and Pressure Vessels Code: an American National Standard. New York, 1989. 150 p.
2. BALABAN MURAT, O. *et al*. "Inactivation of Pectinesterase in Orange Juice by Supercritical Carbon Dioxide". *En: Journal of Food Science*. Florida. Vol. 56, No. 3 (1991); p. 743-746, 750.
3. FORNARI, Chiara *et al*. "Inactivation of *Bacillus Endospores* by High-Pressure Treatment". *En: Industria Conserve*. Italy. Vol. 70(1995); p. 259-265.
4. FRASER, D. *En: Nature*. Vol. 167 (1951); p. 33-34.
5. GERRARD, William. *Solubility of gases and liquids (A graphic approach) Data-causes-prediction*. New York: Plenum Press, 1976. 273 p.
6. HAAS G. J. *et al*. Inactivation of Microorganisms by Carbon Dioxide Under Pressure. *En: Journal foods Safety*. Vol. 9 (1989); p. 253-265.
7. HARA A. *et al*. "Effect of High Pressure on Inactivation of Enzymes and Microorganisms in non Pasteurized Rice Wine Namazake". *En: Nippon Nogikagaku Kashi*. Japan. Vol. 64 (1990); p. 1025-1029.
8. HASHIZUME, Chieko *et al*. "Kinetic Analysis of Yeast Inactivation by High-Pressure Treatment at Low Temperatures". *En: Biosci. Biotech. Biochem*. Japan. Vol. 59, No. 8 (January 1995); p. 1455-1458.

9. HITE. *En: Bulletin of the West Virginia University Agricultural Experimental Station*. USA. Vol. 58 (1899); p 15-35.
10. INSENSCHMID, A. *et al.* "The Influence of Pressure and Temperature of Compressed CO<sub>2</sub> on the Survival of Yeast Cells". *En: Journal of Biotechnology*. Switzerland. Vol. 39 (1995); p. 229-237.
11. JONES R. P. AND GREENFIELD P. F. *En: Enzyme Microbiology and Technology*. Vol. 61 (1982); p. 210.
12. \_\_\_\_\_, "Effect of Carbon Dioxide on Yeast Growth and Fermentation". *En: Enzyme Microbiology and Technology*. Vol. 4(1982); p. 201-203.
13. KAMIHIRA, Masamichi *et al.* "Sterilization of Microorganisms with Supercritical Carbon Dioxide". *En: Agric. Biol. Chem.* Japan. Vol. 51 (1987); p. 407-412.
14. KUMAGAI, H. *et al.* CO<sub>2</sub> "Sorpton by Microbial Cells and Sterilization by High-pressure CO<sub>2</sub>". *En: Biosci. Biotech. Biochemistry*. Vol 61 (1997); p. 931-935.
15. LENA ZG. *et al.* "Perturbation of Membrane Fluidity" *En: J. Bioenerg. Biomembr.* Vol. 7 (1975); p. 223-299.
16. LIN, H. M. *et al.* "Disintegration of Yeast Cells by Pressurized Carbon Dioxide". *En: Biotechnol. Prog.* USA. Vol. 7 (1991); p. 201-204.
17. LIN, H.M. *et al.* "An Improved Method for Disruption of Microbial Cells With Pressurized Carbon Dioxide". *En: Biotechnol. Prog.* USA. Vol. 8 (1992); p.165-166.
18. LINKE, W. F. *Solubilities in organic and metal-organic compounds*. 4<sup>th</sup> edition. New York: Editorial N.J. Van Nostrand, 1965. 2 volúmenes
19. MARQUIS, R. E. "Effects of High Pressure and High-Pressure Gases on Microorganisms". *En: Microbial Enhancement of Oil Recovery-Recent Advances*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1991. p. 207- 218.
20. MARQUIS R.E. "High Pressure Microbiology". *En: Develop. Petrol. Science*. Vol. 31(1991); p. 1-14.
21. MEGYESY, Eugène F. *Manual de Recipientes a Presión. Diseño y Cálculo*. México: Limusa grupo Noriega Editores, 1992. 482 p.
22. MILLER, Jay F. *et al.* "High-Pressure-Temperature Bioreactor for Studying Pressure-Temperature Relationships in Bacterial Growth and Productivity". *En: Biotechnology and Bioengineering*. New York. Vol. 31 (1988); p. 407-413.
23. MOIO, L. *et al.* "Estabilization of Mustes by High Pressure Treatment". *En: Industrie delle Bevande*. Italy. Vol. 23 (1994); p. 436-441.
24. NAKAMURA, Kozo. *et al.* "Disruption of Microbial Cells by the Flash Discharge of High-Pressure Carbon Dioxide". *En: Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Japan. Vol. 58, No. 7 (February 1994); p.1297-1301.
25. OURA *et al.* "Carbon Dioxide Fixation by Baker's Yeast in a Variety of Growth Conditions". *En: J. Gen. Microbiol.* Vol. 118 (1980); p. 51-58.
26. PERRY, Robert H. y CHILTON, Cecil. *Biblioteca del Ingeniero Químico*. 5<sup>a</sup> edición. México: McGraw-Hill, 1984. Vol. 1. 314 p.
27. PITCHARD, J. B. "Toxic Substances and Cell Membrane Function." *En: Fed. Proc.* Vol. 38 (1979); p. 2220-2225.
28. QUIJANO-RICO, M. Y ARENAS, A. "Proceso y sistema para la fermentación semicontinua con una técnica Fed-Batch modificada." Solicitud de patente de invención. (1997).
29. SCHNEIDER, G. *et al.* *Extraction with supercritical gases*. Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie, 1980. p. 45-49.
30. SHIGLEY, J. E. y MISCHKE, C. R. *Diseño en Ingeniería Mecánica*. 5<sup>a</sup> edición. México. Bogotá: McGraw-Hill, 1990. 883 p.
31. STEYTLER, D.C. *et al.* "Biotransformations in Near-Critical Carbon Dioxide". *En: Enzyme Microbiology and Technology*. Vol. 13 (1991); p. 221-226.
- 32- TAUSCHER, Bernhard. "Pasteurization of Food by High Pressure": Chemical Aspects. *En: Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung*. Germany. Vol. 200 (1995); p. 3-13.
33. THAYUMANASAMY, Somasundaram. y LEE, Makowski. "Optical Cell for the Study of Biological Systems Under High Gas Pressures". *En: Review of Scientific Instruments*. USA. Vol. 66, No. 5 (May-1995); p. 3311-3316.
34. THIBAUT, Jules. "Production of Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* Under High-Pressure Conditions". *En: Biotechnology & Bioengineering*. Vol. 30 (1987); p. 74-80.
35. WALPOLE, R. E. y MYERS, R. H. *Probabilidad y Estadística*. 3<sup>a</sup> edición. México D.F. McMillan Publishing Company. 797 p.
36. WEI, C. I. *et al.* "Bacterial Effect of High Pressure CO<sub>2</sub> Treatment on Foods Spiked With *Listeria* or *Salmonella*". *En: Journal of Food Protection*. USA. Vol. 54, No. 3 (March 1991); p.189-193.