

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**DISMINUCION DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS  
MICROORGANISMOS CERVECEROS POR LA ACCION  
DE LOS IONES HIDROGENO**

**TESIS**

**EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

**PRESENTA**

**JORGE CHAVEZ CONTRERAS**

**MONTERREY, N. L.**

**MAYO DE 1994**



TM

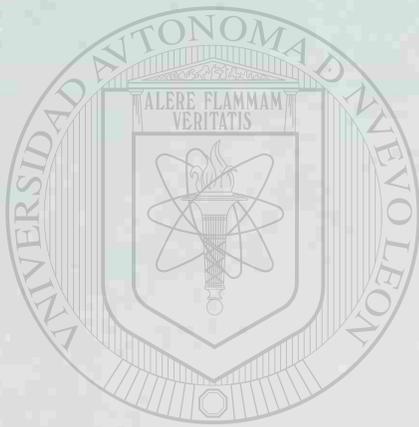
QR151

Ch3

C.1



1080074518



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

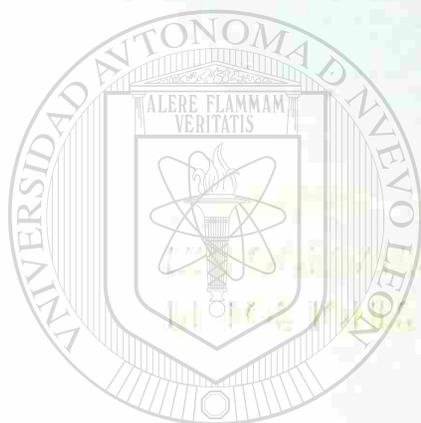
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES



EFECTO DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS  
CULTIVOS DE *YARROUS CEREVISIAE* POR LA ACCIÓN  
DEL  $H_2O_2$  Y  $H_2$  EN EL HIDROGENO

UANL

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

REGISTRADA AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

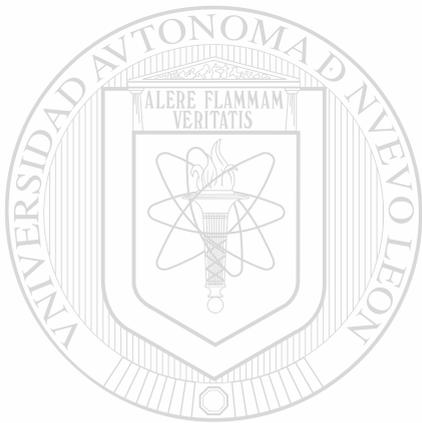
JORGE CHAVEZ CONTRERAS

TEXMEX, N. L.

MAYO DE 1994



TM  
QR 151  
263



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Q.I. ANDRES CERDA ONOFRE**

Director de la Facultad de Ciencias Químicas  
de la Universidad Autónoma de Nuevo León

PRESENTE.-

Mediante este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis elaborada por el Q.F.B. **Jorge Chávez Contreras**, titulada:

**" DISMINUCION DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS CERVECEROS POR LA ACCION DE LOS IONES HIDROGENO."**

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS, ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**, en virtud de haber cumplido integralmente con el reglamento de tesis vigente.

ATENTAMENTE

El Comité Dictaminador:



M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo  
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



M.C. María Teresa Garza González

Sinodal



Dr. Benito Pereyra Alferez

Sinodal

Vo. Bo.



M.C. Martha Alicia Suárez Herrera  
Coordinadora de la Maestría en Microbiología Industrial

## 0. PROLOGO

Esta pequeña parte de la obra, la cual casi siempre, por no generalizar, pasa a ser desapercibida por los lectores, sin tomar en cuenta que es el punto en donde se le puede conocer al autor de un escrito.

De manera muy personal, quiero, aunque se le parezca raro ya que una tesis prologada muy raras veces ocurre, aprovechar la oportunidad para hacer mis comentarios sobre este escrito. Es necesario para mi comentar que el mundo de la microbiología en cualquiera de sus derivados, es tan fascinante que ahora comprendo porque nuestros antiguos maestros entregaban su vida sumidos en las investigaciones microbiológicas, tratando de encontrar explicaciones a los eventos que a simple vista no se imaginaban y que ocurrían en la vida microscópica.

Con este razonamiento, nació una inquietud muy personal: ¿Que pasa con los microorganismos cuando son atacados por agentes nocivos para su desarrollo?.

Es lógico pensar que al igual que todos los organismos vivos se adaptarán o se defenderán de las condiciones adversas a su desarrollo; pero ¿Hasta que punto suele pasar ésto ?.

El trabajo de investigación se originó, a raíz de ver, como, a pesar de que los procesos de fermentaciones alcohólicas cumplían con los requisitos adecuados de sanidad, de pronto, y sin explicación alguna, resultaban brotes de bacterias que se consideraban eliminadas por la acción de los agentes desinfectantes.

Si se revisa este trabajo, se llega a la conclusión de que es investigación aplicada; de cualquier manera, me siento satisfecho de poder contribuir a los conocimientos ya existentes de las bacterias cerveceras, principalmente de los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* así como de *Saccharomyces uvarum*.

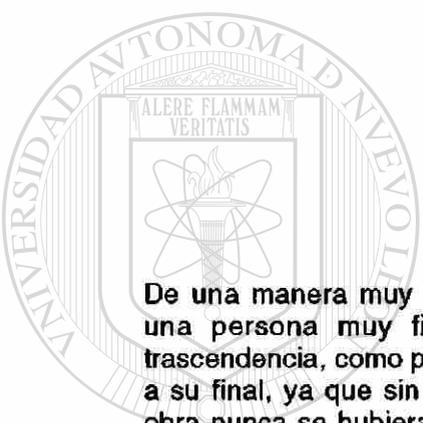
También, a partir de los resultados obtenidos en el trabajo, pude comprender el porqué de algunos comportamientos microbiológicos; como es el caso de la reactivación de las bacterias al encontrarse en condiciones favorables de crecimiento, y en consecuencia la facilidad de reproducción de las mismas al empezar su etapa de crecimiento logarítmico.

Quizás, aquí me dí cuenta de que a pesar de la época en la que estoy viviendo (1992-1993), yo sigo pensando como en la época de la generación espontánea, al no querer aceptar que los microorganismos por muy sencillos que éstos sean, se adaptan muy fácilmente a las condiciones adversas de su crecimiento, para poder cumplir con una de las funciones para las cuales han ido evolucionando a través de los años, ésto es. la conservación de su existencia (Reproducción).

Gracias a la inquietud de investigación que nació en mi respecto a los microorganismos ya mencionados (*Lactobacillus* y *Pediococcus*), y a los efectos que se presentan después de que han sido expuestos a la acción de agentes bactericidas, he asimilado las interrogantes con las cuales empecé la investigación.

***Tesis dedicada por el autor a:***

***Bertha*** mi señora esposa, ***Ana Karlna*** y ***Paulina***, mis dos pequeñas hijitas con todo el cariño que se merecen por el amor, respeto y paciencia que me han tenido.



De una manera muy especial, quiero también dedicar este trabajo, a una persona muy fina a la cual he considerado por orden de trascendencia, como pieza fundamental de que el proyecto haya llegado a su final, ya que sin su apoyo moral y sin sus consejos, quizás esta obra nunca se hubiera realizado.

He de aclarar que gracias a su apoyo, entré en un proceso de reactivación al igual que los microorganismos que son estudiados en este trabajo, aunque parezca un poco raro.

"Don Jorge" muchas gracias por su apoyo, créame, que en todos los momentos de flaqueza , sus consejos me sacaron adelante y el resultado de esa acción aquí está.

Con todo el respeto y estimación que se merece un gran amigo, gracias por todo.

***Sr. "Don Jorge A. Lozano Maldonado"***

## 1. SECCION DE INDICES

1.1 Índice general	.....3
0.-Prólogo	.....1
1.-Sección de índices	.....3
1.1 Índice general	.....3
1.2 Índice de figuras	.....6
2.-Resumen	.....11
3.-Introducción	....12
4.-Antecedentes	....14
4.1 Microorganismos presentes en industria cervecera	....15
4.1.1 Bacterias gram positivas	....15
4.1.1.1 <i>Lactobacillus</i>	....15
4.1.1.2 <i>Pediococcus</i>	....15
4.1.2 Bacterias gram negativas	....15
4.1.2.1 Bacterias acéticas	....15
4.1.2.2 <i>Zymomonas</i>	....16
4.1.2.3 Enterobacteriaceae	....16
4.2 Etapas del proceso cervecero susceptibles a contaminación...	17
4.2.1 Mosto	....17
4.2.2 Levadura de inóculo	....17
4.2.3 Etapa de fermentación	....17
4.2.4 Maduración y acabado	....18
4.3 Control de infecciones microbianas en la ind. cervecera	....18
4.4 Métodos de limpieza y desinfección en la ind. cervecera	....19
4.4.1 Métodos térmicos de desinfección	....19
4.4.1.1 Vapor	....20

4.4.1.2	Agua caliente	....20
4.4.1.3	Pasteurización	....20
4.4.2	Desinfección por medio de radiación	....20
4.4.3	Desinfección por métodos químicos	....21
4.4.3.1	Comuestos clorados	....21
4.4.3.2	Comuestos iodados (Iodóforos)	....21
4.4.3.3	Comuestos bromados	....21
4.4.3.4	Sales cuaternarias de amonio	....22
4.4.3.5	Desinfectantes ácidos	....22
4.5	Detergentes usados en la ind. cervecera	....23
4.5.1	Detergentes alcalinos	....23
4.5.1.1	Detergentes fuertemente alcalinos	....23
4.5.1.2	Detergentes alcalinos fuertes	....23
4.5.1.3	Detergentes alcalinos moderados	....24
4.5.2	Agentes de limpieza ácidos (Detergentes)	....24
4.5.2.1	Agentes fuertemente ácidos	....24
4.5.2.2	Agentes moderadamente ácidos	....24
4.6	Generalidades del control sanitario de ind. alimentarias	....24
4.6.1	Generalidades sanitarias en la industria cervecera	....24
4.6.2	Generalidades sanitarias en otros alimentos	....27
<hr/>		
5.-	Hipótesis	....30
6.-	Objetivos	....30
7.-	Materiales y métodos	....31
7.1	Diseño del experimento	....31
7.1.1	Muestras de pH	....31
7.1.2	Selección del tiempos de exposición	....31
7.1.3	Concentración de microorganismos a evaluar	....31
7.2	Preparación de Medios de cultivo	....32

7.2.1 Medio de cultivo YMA	....32
7.2.2 Medio de cultivo UBA	....32
7.2.3 Medio de cultivo para <i>Pediococcus</i>	....32
7.3 Obtención de microorganismos	....32
7.3.1 <i>Saccharomyces uvarum</i>	....33
7.3.2 <i>Lactobacillus spp</i>	....33
7.3.3 <i>Pediococcus spp</i>	....34
7.4 Cinética de crecimiento	....35
7.5 Preparación del nefelómetro de Mc Farland	....35
7.6 Preparación de material y reactivos para la prueba	....35
7.7 Método	....36
7.7.1 Exposición de los microorganismos al pH ácido	....37
<b>8.-Resultados y discusión</b>	<b>....39</b>
8.1 Cinética de crecimiento de los microorganismos en estudio...	39
8.1.1 Curva de calibración para determinar el número de microorganismos	....39
8.1.2 Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces uvarum</i>	....40
8.1.3 Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus spp</i>	....41
8.1.4 Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus spp</i>	....42
8.2 Resultados de los efectos del pH sobre los microorganismos.	43
8.2.1 Resultados a los treinta minutos de exposición	....43
8.2.2 Resultados a los sesenta minutos de exposición	....44
8.2.3 Resultados a los noventa minutos de exposición	....44
8.2.4 Resultados a los cuarenta y cinco minutos de exposición....	45
8.2.5 Resultados a los cincuenta y cinco minutos de exposición	....46
8.3 Resultados de la efectividad bactericida del pH sobre los microorganismos	....47
8.3.1 Concentración de $4.0 \times 10^5$ microorganismos/ml	....47
8.3.2 Concentración de $4.0 \times 10^6$ microorganismos/ml	....48

8.3.3	Concentración de $16.0 \times 10^6$ microorganismos/ml	....49
8.3.4	Concentración de $28.0 \times 10^6$ microorganismos/ml	....50
<b>9.-Conclusiones</b>		<b>....74</b>
<b>10.-Literatura citada</b>		<b>....76</b>
<b>11.-Agradecimientos</b>		<b>....80</b>
<b>12.-Vita</b>		<b>....81</b>
<b>1.2 Índice de figuras</b>		<b>.....6</b>
<b>Figura 1</b>	Curva de calibración para determinar microorganismos por ml	<b>....39</b>
<b>Figura 2</b>	Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces uvarum</i>	<b>....40</b>
<b>Figura 3</b>	Curva de crecimiento de <i>Pediococcus spp</i>	<b>....41</b>
<b>Figura 4</b>	Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus spp</i>	<b>....42</b>
<hr/>		
<b>Figura 5</b>	Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (400 mil células / ml), a 30 min. de exposición.	<b>....52</b>
<b>Figura 6</b>	Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (4 millones de células / ml), a 30 min. de exposición.	<b>....52</b>
<b>Figura 7</b>	Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (16 millones de células / ml), a 30 min. de exposición.	<b>....53</b>
<b>Figura 8</b>	Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos	

(28 millones de células / ml), a 30 min. de exposición.	.....53
<b>Figura 9</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (400 mil células / ml), a 60 min. de exposición.	.....54
<b>Figura 10</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (4 millones de células / ml), a 60 min. de exposición.	.....54
<b>Figura 11</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (16 millones de células / ml), a 60 min. de exposición.	.....55
<b>Figura 12</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (28 millones de células / ml), a 60 min. de exposición.	.....55
<b>Figura 13</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (400 mil células / ml), a 90 min. de exposición.	.....56
<b>Figura 14</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (4 millones de células / ml), a 90 min. de exposición.	.....56
<b>Figura 15</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (16 millones de células / ml), a 90 min. de exposición.	.....57
<b>Figura 16</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (28 millones de células / ml), a 90 min. de exposición.	.....57
<b>Figura 17</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (400 mil células / ml), a 120 min. de exposición.	.....58
<b>Figura 18</b> Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (4 millones de células / ml), a 120 min. de exposición.	.....58

<b>Figura 19</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (16 millones de células / ml), a 120 min. de exposición.</b>	<b>.....59</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (28 millones de células / ml), a 120 min. de exposición.</b>	<b>.....59</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (400 mil células / ml), a 150 min. de exposición.</b>	<b>.....60</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (4 millones de células / ml), a 150 min. de exposición.</b>	<b>.....60</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (16 millones de células / ml), a 150 min. de exposición.</b>	<b>.....61</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (28 millones de células / ml), a 150 min. de exposición.</b>	<b>.....61</b>
<b>Figura 25</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (400 mil células / ml), a 180 min. de exposición.</b>	<b>.....62</b>
<b>Figura 26</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (4 millones de células / ml), a 180 min. de exposición.</b>	<b>.....62</b>
<b>Figura 27</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (16 millones de células / ml), a 180 min. de exposición..</b>	<b>.....63</b>
<b>Figura 28</b>	<b>Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (28 millones de células / ml), a 180 min. de exposición.</b>	<b>.....63</b>

**Figura 29** Evaluación bactericida del pH 2.00 con 400 mil Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....64

**Figura 30** Evaluación bactericida del pH 2.25 con 400 mil Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....64

**Figura 31** Evaluación bactericida del pH 2.50 con 400 mil Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....65

**Figura 32** Evaluación bactericida del pH 2.75 con 400 mil Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....65

**Figura 33** Evaluación bactericida del pH 3.00 con 400 mil Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....66

**Figura 34** Evaluación bactericida del pH 2.00 con 4 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....66

**Figura 35** Evaluación bactericida del pH 2.25 con 4 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....67

**Figura 36** Evaluación bactericida del pH 2.50 con 4 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....67

**Figura 37** Evaluación bactericida del pH 2.75 con 4 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....68

**Figura 38** Evaluación bactericida del pH 3.00 con 4 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición. ....68

**Figura 39** Evaluación bactericida del pH 2.00 con 16 millones de Cel./ml

a diferentes tiempos de exposición.	.....69
<b>Figura 40</b> Evaluación bactericida del pH 2.25 con 16 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....69
<b>Figura 41</b> Evaluación bactericida del pH 2.50 con 16 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....70
<b>Figura 42</b> Evaluación bactericida del pH 2.75 con 16 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....70
<b>Figura 43</b> Evaluación bactericida del pH 3.00 con 16 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....71
<b>Figura 44</b> Evaluación bactericida del pH 2.00 con 28 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....71
<b>Figura 45</b> Evaluación bactericida del pH 2.25 con 28 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....72
<b>Figura 46</b> Evaluación bactericida del pH 2.50 con 28 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....72
<b>Figura 47</b> Evaluación bactericida del pH 2.75 con 28 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....73
<b>Figura 48</b> Evaluación bactericida del pH 3.00 con 28 millones de Cel./ml a diferentes tiempos de exposición.	.....73

## 2. RESUMEN

Los niveles muy ácidos de pH sobre los microorganismos cerveceros presentan acción bactericida, como se pudo demostrar en los experimentos realizados en esta investigación, también se pudo observar, que los *Lactobacillus spp* son más susceptibles a los efectos desinfectantes del pH ácido que los *Pediococcus spp*, inclusive a las concentraciones de  $16.0 \times 10^6$  y  $28.0 \times 10^6$  microorganismos por ml, se pudo establecer una relación de resistencia a los efectos biocidas del pH de aproximadamente 0.8 veces mayor en los *Pediococcus spp* que en los *Lactobacillus spp*, sobre todo en los valores de pH de 2.50, 2.75 y 3.00. Es importante hacer notar que en los casos en donde las cuentas viables fueron muy bajas, la mayoría de las veces se pudo realizar un análisis de la curva de crecimiento de los microorganismos en estudio, aunque la fase de adaptación de esas cinéticas de crecimiento fué de tres días.

Para el caso de *Saccharomyces uvarum*, la levadura fué capaz de soportar niveles de pH bajos (2.00-2.25), situación que le dá posibilidades de sobrevivir a tratamientos drásticos con soluciones de pH que fluctuen por encima de 2.00.

El efecto del pH ácido sobre los microorganismos estudiados, muestra un comportamiento selectivo, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos, los *Lactobacillus spp* son destruidos más rápidamente que los *Pediococcus spp* y a la vez, éstos son eliminados más fácilmente que las levaduras. Se debe de tomar en cuenta que la evaluación de los efectos desinfectantes del pH ácido se realizó por separado para cada microorganismo en particular, quedando abierta la posibilidad de evaluar el comportamiento de los microorganismos haciendo una mezcla entre ellos y posteriormente exponerlos a los efectos del pH ácido.

### 3. INTRODUCCION

Anualmente se reportan pérdidas por miles de nuevos pesos en la industria de fermentaciones alcohólicas, debido a la mala calidad de los productos que elaboran. La mayoría de las veces es debido a alteraciones producidas por contaminaciones bacterianas (Dziezack, 1987), las cuales se presentan por un mal manejo de los sistemas de limpieza, así como también de los inóculos que se producen para usarse en los procesos fermentativos (Fowell, 1967).

No es deseable que este tipo de pérdidas se presente de manera frecuente, por lo que, hay interés en las industrias de fermentaciones alcohólicas por encontrar métodos de sanidad que sean efectivos y que además presenten un marco de seguridad para el manejo de los microorganismos fermentadores (Brian y Stepharopulos, 1986). Anualmente, las empresas afectadas por pérdidas debidas a la contaminación microbiológica de sus productos, invierten una gran cantidad de dinero en las áreas de investigación y desarrollo, tratando de mejorar día con día la tecnología de sus procesos sanitarios y la calidad de sus productos (Frazier, 1973).

En el caso de levaduras, *Lactobacillus* y *Pediococcus* estos se encuentran formando sociedades en las fermentaciones alcohólicas y también en las materias primas que se utilizan para la elaboración de los productos (Buchanan y Gibbons 1980).

Si se hace una evaluación de los microorganismos de manera individual, se verá que cada uno de ellos tiene un metabolismo propio, quizás muy relacionado en cuanto a producción de metabolitos secundarios (ácido láctico y diacetilo), aunque también se pueden presentar diferencias en las necesidades nutricionales para cada género.

---

Se ha comprobado que los *Lactobacillus spp* así como los *Pediococcus spp*, requieren de algunos ingredientes especiales para crecer, por ejemplo; ácido nicotínico, biotina, riboflavina y piridoxina, a demás de requerir aminoácidos como fuente de nitrógeno. ®

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todos estos compuestos son proporcionados a las bacterias por las levaduras que se utilizan como inóculo en los procesos fermentativos, también el mosto que se utiliza en la fermentación, les sirve como fuente de nitrógeno ya que éste lleva una gran cantidad de aminoácidos.

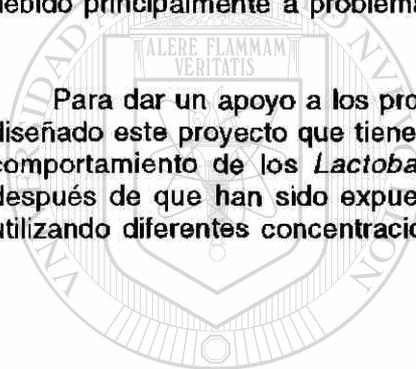
Además, en el caso de la industria cervecera, las condiciones ambientales del proceso de fermentación son favorables para su desarrollo (Anaerobiosis, alta concentración de fuentes vitamínicas, pH ácido).

El problema se presenta cuando estos microorganismos se establecen en los procesos fermentativos como agentes contaminantes, proporcionándole al líquido de fermentación los productos de su metabolismo (ácido láctico y diacetilo), alterando el aroma y sabor del producto final. Se ha encontrado que a concentraciones de 0.14 mg/ml el diacetilo altera la calidad organoléptica de la cerveza.

Como los microorganismos lácticos son considerados flora normal de las industrias cerveceras, es muy difícil que se puedan eliminar de estos procesos, por lo tanto se han buscado alternativas para mantener bajo control a esos gérmenes, para disminuir la posibilidad de que se presenten alteraciones en el producto final debido a problemas de contaminación bacteriana.

La industria de fermentaciones alcohólicas, destina una parte de su economía a implementar sistemas de sanidad dentro de su proceso, para tratar de eliminar o controlar a las bacterias lácticas, tratando de minimizar con esas acciones las pérdidas económicas debido principalmente a problemas de contaminación microbiana.

Para dar un apoyo a los procesos sanitarios aplicados en la industria cervecera, se ha diseñado este proyecto que tiene como finalidad el proporcionar más información acerca del comportamiento de los *Lactobacillus spp*, *Pediococcus spp* y *Saccharomyces uvarum*, después de que han sido expuestos a diferentes valores de pH, tiempos de exposición y utilizando diferentes concentraciones de microorganismos.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### **4. ANTECEDENTES**

Las fábricas productoras de bebidas alcohólicas como las industrias cerveceras, deben de mantener sus cultivos de levaduras, libres de agentes contaminantes (Frazier 1973).

Es importante eliminar los microbios indeseables de los inóculos que se usan en las fermentaciones alcohólicas para que no causen problemas de contaminación, también es importante que no se presenten condiciones sanitarias muy pobres en las áreas de almacén de levaduras de inóculo por considerarse uno de los principales focos de infección en este tipo de industrias (Campbell, 1987).

Procedimientos sanitarios poco efectivos, pueden provocar una alta incidencia de contaminación, aumentando la posibilidad de que el producto final tenga problemas de calidad (Stanton, 1971).

Es muy difícil que se logren condiciones de esterilidad en el proceso fermentativo en general, pero se puede mantener bajo control a la flora microbiana presente, sin que se genere alguna alteración en la calidad de los productos finales (Rainbow, 1975).

Por naturaleza, las fábricas cerveceras pueden mantener un control de los microorganismos patógenos, debido a que las condiciones ambientales del proceso, proporciona condiciones de sanidad que no permite el desarrollo de este tipo de microbios, estas condiciones son: Bajos valores de pH, altas concentraciones de alcohol, valores altos de CO<sub>2</sub> y la presencia de las resinas amargas del lúpulo que actúan como inhibidores del crecimiento de los microorganismos presentes en el ambiente cervecero (Hough et al, 1971).

Las bacterias que predominan en este tipo de industrias, son microorganismos no esporulados que contribuyen a la formación de una gran variedad de problemas; principalmente de pH elevado, acetificación, fermentación incompleta, viscosidad, arranques lentos en fermentación, olores y sabores desagradables.

(Hough et al, 1971) Han sugerido que algunas infecciones son directa e indirectamente responsables de desviaciones de aroma, sabor y turbidez bacteriológica en el producto terminado.

## **4.1 TIPO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA INDUSTRIA CERVECERA**

La flora microbiana presente en la industria cervecera se puede clasificar en dos tipos; dependiendo de las características tintoriales y morfológicas de los microorganismos involucrados, éstos se clasifican en:

### **4.1.1 Bacterias gram positivas:**

Bajo este sistema de clasificación, dentro de estos microbios se encuentran los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

#### **4.1.1.1 *Lactobacillus***

Son microorganismos en forma de baston largo, agrupados a pares o en cadenas pequeñas, no móviles, no esporulados, catalasa negativa, son microaerofílicos, que crecen muy bien a las condiciones de fermentación que predominan en el proceso cervecero. Dentro de su actividad metabólica se caracterizan por producir ácido láctico, ácido acético y diacetilo, soportan muy bien las condiciones de acidez de la cerveza, inclusive se reportan cepas que soportan valores de pH cercanos 2.50 (Campbell, 1987).

#### **4.1.1.2 *Pediococcus***

Son microorganismos con forma de coco agrupados a pares, por lo general en tetradas, no tienen motilidad, son gram positivos, catalasa negativa, no esporulados, microaerofílicos, crecen muy bien bajo las condiciones de fermentación de la cerveza, dentro de su metabolismo producen ácido láctico y diacetilo. Este microorganismo se deposita en el fondo de los tanques de fermentación durante el proceso fermentativo, manteniendo una relación estrecha con las levaduras del proceso, soportan además las condiciones de acidez y de altas concentraciones de alcohol, propias del sistema (Hough et al., 1971).

### **4.1.2 Bacterias gram negativas:**

Dentro de las bacterias gram negativas que forman parte de la flora microbiana de las industrias cerveceras se encuentran las bacterias acéticas la cual se conforma por dos tipos de microorganismos. El género *Acetobacter* y el género *Acetomonas*. Este tipo de microorganismos son bastones cortos no esporulados tienen motilidad positiva, son aerobios, poseen un metabolismo oxidativo, no crecen bajo las condiciones de fermentación de la cerveza, son frágiles al pH ácido y a las condiciones de anaerobiosis del mismo

proceso, producen ácido acético mediante la oxidación del etanol. Estos microorganismos suelen presentarse en la etapa de producción del mosto (Hough et al., 1971).

#### **4.1.2.1 *Zymomonas* .**

Es un microorganismo gram negativo, no esporulado, tiene motilidad positiva, microaerófilico, se multiplica rápidamente y crece a un amplio rango de pH. Es muy raro que se presente en el proceso de producción de cerveza, sin embargo la desviación metabólica que produce está relacionada con la producción de H<sub>2</sub>S, no oxida el etanol (Kleyn, 1971).

#### **4.1.2.2 *Enterobacteriaceae*.**

Son bacterias gram negativas, la mayoría de ellas presentan motilidad, las más comunes son las coliformes que se caracterizan por crecer rápidamente en el mosto y producen diferentes alteraciones en el aroma y sabor de la cerveza, son inhibidas en su crecimiento en el proceso de fermentación, debido al bajo pH y a la concentración de etanol en el medio, desgraciadamente los productos de su metabolismo son muy difíciles de eliminar de la cerveza, por lo cual es recomendable que no contaminen el mosto, siendo éste, su principal vía de contaminación (Fowell, 1967).

Otros microorganismos como *Pectinatus* y *Hafnia* no son considerados dentro de este contexto por ser muy raros en el proceso cervecero. Esto no implica, que no se presenten como focos de infección dentro del mismo.

A demás de las bacterias ya mencionadas, el proceso cervecero también está expuesto a las contaminaciones por levaduras silvestres y algunos tipos de hongos. Estos agentes infecciosos de la cerveza no se estudian en este trabajo de investigación.

El uso repetido de las levaduras de inóculo en el proceso, combinado con un mal manejo sanitario de la misma, incrementa las posibilidades de contaminación por los agentes mencionados, si a esto, se suman malas condiciones sanitarias de la planta, el resultado será un producto de baja calidad provocado por las alteraciones de aroma y sabor en la cerveza terminada.

Como se ha estado mencionando, es muy difícil que las bacterias sean eliminadas en su totalidad del proceso, pero es muy necesario que se mantengan bajo control para evitar la proliferación de las mismas. Bajo estas condiciones, no habrá pérdidas en el proceso debido a una mala calidad del producto. La manera más segura de controlar a estos

microorganismos es manteniendo condiciones óptimas de limpieza de las plantas y ésto dependerá de las técnicas de sanidad que se utilizen (Kleyn y Hough, 1971).

#### **4.2 ETAPAS DEL PROCESO CERVECERO SUSCEPTIBLES A CONTAMINACION MICROBIOLÓGICA**

Las diferentes etapas del proceso cervecero son susceptibles a contaminaciones microbiológicas, pero hay algunas áreas que están más expuestas a las contaminaciones que otras. Las más afectadas son:

##### **4.2.1 Mosto**

Los tipos de microorganismos que pueden contaminar al mosto con facilidad son las bacterias coliformes, algunas cepas son termofílicas ya que pueden crecer a 40° C . El principal foco de infección de estos microorganismos es el agua que se utiliza para lavar el equipo y la que se usa en los sistemas de enfriamiento. La gran capacidad de multiplicación de los microorganismos coliformes los hace sumamente peligrosos para el proceso, y además por su metabolismo muy activo pueden proporcionar desviaciones de aroma y sabor en la cerveza (Campbell, 1987).

##### **4.2.2 Levadura de Inóculo**

Se considera el principal punto de entrada de los microorganismos contaminantes del proceso cervecero. Las bacterias que logran establecerse en esta etapa de producción, tienen muchas posibilidades de sobrevivir a los métodos de sanidad aplicados a la levadura de inóculo (Rainbow, 1975).

---

Los microorganismos que suelen acompañar al inóculo cuando está en malas condiciones de sanidad son las bacterias lácticas (*Lactobacillus* y *Pediococcus*), Enterobacterias, bacterias acéticas, *Pectinatus*, *Hafnia* y *Zymomonas*.<sup>®</sup>

#### **DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

Todos estos microorganismos tienen la capacidad de proporcionarle a la cerveza desviaciones aromáticas, que de alguna manera alteran su calidad final (Rainbow, 1966).

Los microorganismos contaminantes de la levadura se introducen a la misma ya sea por la mala desinfección de los tanques de fermentación, por la exposición de la levadura al aire ambiente, o por las malas condiciones de sanidad de los recipientes que la contienen (Stanton, 1971).

### 4.2.3 Fermentación

Se puede considerar la etapa de fermentación como un paso de autodepuración de contaminantes, ya que aquí, debido a las condiciones ambientales de esta etapa, muchas bacterias son destruidas a causa del pH ácido, altas concentraciones de alcohol, condiciones de anaerobiosis, las bajas temperaturas normales del proceso, alta actividad metabólica de la levadura y a la presencia de las resinas amargas extraídas del lúpulo (Saudegren y Enebo, 1965).

Las bacterias que sobreviven bajo estas condiciones ambientales son los *Lactobacillus* y *Pediococcus*, pudiendo pasar a las siguientes etapas del proceso, proporcionándole al mismo los desechos de su actividad metabólica.

Las bacterias que se establecen en esta área provienen de la levadura de inóculo, o de los residuos de suciedad dejados después del proceso de desinfección en los tanques en donde se lleva a cabo la fermentación (Eschenbecher, 1968/1969).

### 4.2.4 Maduración y acabado

Como son etapas totalmente anaeróbicas, las bacterias que predominan aquí son las que logran pasar de fermentación a esta etapa del proceso y también las que pudieron haber quedado como residuos después de el proceso de limpieza en los tanques donde se deposita la cerveza (Hough, 1971).

## 4.3 CONTROL DE INFECCIONES MICROBIANAS EN LA INDUSTRIA CERCERA

Las contaminaciones en los procesos cerveceros son controladas mediante la eliminación de los desechos sólidos que se encuentran en las áreas que están en contacto con el líquido fermentado y también con la remoción de los microorganismos causantes del problema infeccioso. Stanton, 1971., establece que la cerveza por sí misma elimina a la mayoría de los microorganismos presentes en el proceso, en un período de cinco a siete días, pero esto, no es suficiente para asegurar que se obtendrá un producto de buena calidad.

La manera más efectiva de prevenir las infecciones bacterianas en el proceso de elaboración de la cerveza, es controlando a los agentes infecciosos mediante un programa apropiado de limpieza y desinfección.

A demás, es importante que los inóculos se mantengan en condiciones óptimas de sanidad ya que son las vías principales de contaminación durante la elaboración de la cerveza.

En los procesos de elaboración de cerveza se utilizan técnicas de sanidad que nos ayudan a mantener bajo control a la mayoría de los microorganismos contaminantes que se involucran en el ambiente de fermentación, estas técnicas son las que se aplican en la mayoría de las industrias alimenticias con la finalidad de mantener a los procesos en óptimas condiciones sanitarias.

#### **4.4 METODOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCION USADOS EN LA INDUSTRIA CERVECERA**

Hay cinco pasos que se consideran fundamentales para lograr condiciones de sanidad en las industrias de bebidas.

1.-Lavar para remover los desechos y partículas orgánicas no adherentes, humedecer las áreas a limpiar, e incrementar la efectividad de los agentes limpiadores (Detergentes).

2.-Aplicación de los detergentes para proporcionar un adherencia más uniforme entre el agua y las superficies a lavar y así facilitar la remoción de los desechos orgánicos.

3.-Enjuagar para remover las partículas dispersas y los residuos del detergente utilizado.

4.-Aplicación del agente desinfectante para eliminar los microorganismos residuales.

5.-Enjuagar para eliminar los residuos del agente desinfectante aplicado, antes de exponer en las áreas desinfectadas al material de producción.

Las reglas o métodos sanitarios que se aplican para mantener bajo control a los microorganismos dependerá de los tipos de microbios a tratar y de las necesidades de la industria de aplicar algunos métodos específicos. En general la industria cervecera utiliza diferentes técnicas sanitarias dentro del proceso de producción para lograr condiciones sanitarias óptimas, se pueden citar:

#### **4.4.1 Métodos térmicos de desinfección**

Por estos métodos los microorganismos son destruídos mediante el uso de temperaturas altas. Los métodos más utilizados son el vapor, uso de agua caliente y pasteurización (Stanton, 1971).

##### **4.4.1.1 Vapor**

Se requiere del uso de grán cantidad de energía. Debido a las altas temperaturas utilizadas en el método, es común que se presente la formación de depósitos orgánicos, que facilitan la protección de los microorganismos contaminantes y por lo tanto, se requiere de la aplicación de temperaturas más elevadas para lograr su destrucción. (Stanton, 1971).

##### **4.4.1.2 Agua caliente**

El método se presta para desinfectar partes de equipo, principalmente aquellas que son difíciles de tratar por medios mecánicos, como por ejemplo; válvulas, empaques, uniones, atemperadores. La temperatura del agua debe de estar a 80<sup>0</sup> C, el problema de la técnica es el control de la temperatura, ya que es muy difícil mantenerla constante (Bailey et al., 1986).

##### **4.4.1.3 Pasteurización**

El método se usa en muchas industrias de alimentos para prolongar la vida de anaquel del producto. En la industria cervecera, es común que la pasteurización se aplique al producto envasado, con la finalidad de eliminar a las bacterias y/o levaduras que logran llegar al producto final. La aplicación de la pasteurización implica un gasto muy fuerte para la industria cervecera por la gran cantidad de energía que necesita el proceso y por el mantenimiento del equipo. En la actualidad se está tratando de encontrar nuevas técnicas que ayuden a mantener por largos periodos en el mercado al producto final (Kleyn y Hough, 1971).

#### **4.4.2 Desinfección por medio de radiación**

El uso de la luz ultravioleta como un método de desinfección en la producción de bebidas es un poco rutinario; su principal utilidad está en las plantas tratadoras de agua, algunas industrias la utilizan para desinfectar superficies que no están expuestas al aire ambiente y que son de poco acceso para el personal. Esta tecnología tiene sus limitantes ya que no es muy efectiva en superficies muy grandes y su efecto se inactiva muy fácilmente por la presencia de material orgánico (Stanton, 1971).

### **4.4.3 Desinfección por métodos químicos**

Los desinfectantes químicos disponibles para su uso en la industria de alimentos, varían en su composición química y actividad, dependiendo de las condiciones de su uso.

Los desinfectantes más concentrados, son los más rápidos y efectivos en su acción. Debido a que los desinfectantes químicos carecen de la habilidad de penetración, los microorganismos que se alojan en las grietas, cavidades y cuarteaduras, no son destruidos en su totalidad.

La efectividad de los agentes desinfectantes se ve alterada por algunos factores físicos y químicos como son: Tiempo de exposición, temperatura, concentración, pH, dureza del agua, reacción con compuestos que disminuyen la actividad del agente desinfectante y la formación de aglomerados bacterianos.

Dentro de los agentes químicos utilizados en la industria de bebidas se encuentran:

#### **4.4.3.1 Compuestos clorados**

La actividad bactericida de los compuestos clorados se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas, destrucción de ácidos nucleicos, alteración de la síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas (Robinson et al., 1988).

Los compuestos clorados más utilizados son: Cloro líquido, hipoclorito, cloraminas inorgánicas y dióxido de cloro.

#### **4.4.3.2 Compuestos iodados (Iodóforos)**

La actividad bactericida de estos compuestos no está bien establecida, son muy reactivos a pH ácido.

#### **4.4.3.3 Compuestos bromados**

Se utilizan en combinación con otros compuestos para aumentar su actividad bactericida.

#### **4.4.3.4 Sales cuaternarias de amonio**

Las sales cuaternarias de amonio son muy penetrantes y humectantes, se utilizan en la desinfección de paredes, pisos y equipo en la industria de bebidas, los más utilizados son los detergentes catiónicos (Alkildimetilbencilamonio), este tipo de detergentes no son utilizados en la industria cervecera.

#### **4.4.3.5 Desinfectantes ácidos**

A bajas concentraciones no son tóxicos, pero tienen actividad biológica. Se combinan en las etapas de lavado y desinfección en los procesos sanitarios de las industrias de elaboración de bebidas alcohólicas.

Estos agentes desinfectantes, destruyen a los microorganismos mediante la penetración y destrucción de la membrana celular y también por la disociación de las moléculas ácidas y consecuentemente acidificando el interior de la célula

El tratamiento ácido se dosifica, dependiendo del tipo de microorganismo contaminante, son muy efectivos en superficies de acero inoxidable o en donde los tiempos de contacto son prolongados. Las bacterias que sobreviven a bajos valores de pH, tienen la capacidad de prevenir la absorción de los iones hidrógeno o de expulsarlos tan rápidamente como son absorbidos.

Los ácidos orgánicos como el acético, láctico, propiónico y fórmico son los más utilizados (Robinson et al., 1988).

El uso de los desinfectantes químicos en la industria cervecera es de gran utilidad en las diferentes etapas del proceso, dependiendo de las necesidades sanitarias, se selecciona el agente a usar.

Para la desinfección de la levadura de inóculo en el proceso cervecero se recomienda la utilidad de agentes desinfectantes ácidos. En el uso de estos agentes es muy necesario tener cuidado con las concentraciones, ya que valores de pH muy ácido, pueden alterar las características bioquímicas, fisiológicas y fermentativas de la levadura, e inclusive destruirla por completo.

## **4.5 DETERGENTES UTILIZADOS EN LAS TECNICAS SANITARIAS DE LAS INDUSTRIAS CERVECERAS**

Son diversos los detergentes utilizados en la industria de bebidas, la principal función de éstos es; disminuir la tensión superficial del agua sobre las áreas a lavar, para poner en suspensión el material sólido insoluble compuesto en su mayoría por materia orgánica residual. Una vez puesto en solución el material, éste se elimina por medio de flujo de agua.

Para completar el proceso de sanidad, se adiciona el agente desinfectante seleccionado para destruir los microorganismos residuales que fueron expuestos por el detergente utilizado.

Los detergentes se clasifican de acuerdo a sus características en:

### **4.5.1 Detergentes alcalinos**

El termino pH, frecuentemente se usa en la ingeniería sanitaria para describir la naturaleza de las soluciones de limpieza o detergentes. Si el pH es una medición logarítmica de la concentración de los iones hidrógeno, a los valores de 7 a 14 se clasifica al detergente como alcalino; a pH de 7 a 0 es un detergente ácido (Stanton, 1971).

De acuerdo a esta referencia, los detergentes alcalinos se subclasifican en:

---

#### **4.5.1.1 Detergentes fuertemente alcalinos**

Tienen un fuerte poder de disolución, son muy corrosivos, producen quemaduras y ulceraciones en la piel; son altamente corrosivos, un contacto prolongado puede destruir los tejidos. Al mezclarse estos compuestos con el agua se produce una reacción altamente exotérmica. Los más comunes son el Hidróxido de sodio y los silicatos.

#### **4.5.1.2 Detergentes alcalinos fuertes**

Tienen un moderado poder de disolución, no son corrosivos, los ingredientes activos de este tipo de agentes son; Metasilicatos, metafosfatos, pirofosfatos etc.

### **4.5.1.3 Detergentes alcalinos moderados**

Por lo general se encuentran en solución, los más utilizados son; Carbonato de sodio, sesquicarbonato de sodio, pirofosfato de tetrasodio etc.

### **4.5.2 Agentes de limpieza ácidos (Detergentes)**

Son muy efectivos para remover depósitos de sales minerales que son el resultado del uso de detergentes alcalinos. Al igual que los detergentes alcalinos se clasifican de acuerdo a su poder de disolución.

#### **4.5.2.1 Agentes fuertemente ácidos**

Son muy corrosivos al concreto y los metales, son utilizados para eliminar formaciones de sales minerales y de compuestos orgánicos, los más utilizados son; ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, sulfhídrico y fosfórico.

#### **4.5.2.2 Agentes moderadamente ácidos**

Tienen moderada actividad corrosiva, son alergénicos; ejemplo de éstos son el ácido lebulínico, hidroxiacético y ácido glucónico.

El tipo de residuo sólido a eliminar, determinará que agente de limpieza debe de ser utilizado. Para remover los desechos sólidos se recomienda el uso de los detergentes fuertemente alcalinos.

## **4.6 CONCEPTOS GENERALES DEL CONTROL SANITARIO DE LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

### **4.6.1 Generalidades sanitarias en la industria cervecera**

Las técnicas sanitarias a utilizar en el proceso cervecero, dependerá de las características que presenten los desechos sólidos a eliminar. Si hay problemas de contaminación microbiológica, se debe de tomar en consideración al agente contaminante, para seleccionar el método de desinfección más adecuado.

En la limpieza de las superficies, como las paredes, pisos, interiores de tanques, sistemas de bombeo y líneas rígidas, se recomienda el uso de los detergentes fuertemente alcalinos por la facilidad que tienen de remover los sólidos orgánicos y de disminuir las cargas microbianas que se encuentran presentes en las superficies a lavar. Si las condiciones sanitarias del proceso son muy malas, se debe de incrementar la concentración del agente dispersante, para facilitar la actividad biocida de la técnica desinfectante seleccionada para eliminar los microorganismos (Santon, 1971).

Los agentes desinfectantes más empleados para hacer la sanitización de superficies tanto de pisos, paredes así como de tanques y materia prima son los derivados de cloro, compuestos iodóforos, sales cuaternarias de amonio y los agentes ácidos. Las concentraciones utilizadas varían dependiendo de las condiciones sanitarias de la planta (Robinson et al., 1988).

Como se ha comentado anteriormente, el uso de temperaturas altas en sus diferentes técnicas y de la luz ultravioleta, queda muy restringido a situaciones especiales del proceso, por ejemplo; La pasteurización del producto terminado, el uso de vapor para lavado y sanidad de tanques de fermentación, aplicación de luz ultravioleta para disminuir cargas microbianas principalmente en las áreas de fermentación y almacén del inóculo.

El proceso cervecero es un medio propicio para el desarrollo de microorganismos debido a la presencia de una gran cantidad de nutrientes como carbohidratos, aminoácidos, micronutrientes, que son esenciales para el crecimiento de una gran variedad de microbios.

Sin embargo, el ambiente propiciado por la misma fermentación, disminuye el número de microbios que pueden infectar a la cerveza, además, manteniendo buenas condiciones de sanidad, es factible que se logre controlar la capacidad infectiva de todos ellos.

Es importante que al momento de diseñar un método de sanidad para su aplicación en la industria alimentaria, se tome en cuenta la respuesta que pueden presentar los microbios a dichos tratamientos, ya que de ello dependerá el éxito de la técnica utilizada (Robinson, 1972).

El control microbiológico que se realiza en la industria cervecera, incluye, todas las materias primas, instalaciones internas y externas de la fábrica, manteniendo un primordial interés en la parte central del proceso como lo es el área de producción (Rainbow, 1975).

Pese a todos los sistemas sanitarios aplicados en el proceso, hay microorganismos como los *Lactobacillus* y *Pediococcus* que son muy difíciles de eliminar y que se adaptan muy bien al mismo. Si este tipo de microorganismos logran establecerse principalmente en la etapa de fermentación y en la levadura de inóculo, podrán multiplicarse de tal manera, que los compuestos derivados de su metabolismo, le proporcionarán al producto terminado alteraciones de aroma y sabor (Campbell, 1987).

No hay una explicación del porque estas bacterias, sobreviven mejor en los procesos de fermentación tipo lager, las cuales son más afectadas por este tipo de contaminantes que las fermentaciones tipo ale, a pesar de estas características mencionadas, las bacterias lácticas pueden producir problemas de contaminación en los diferentes procesos de producción de cerveza. Los principales productos del metabolismo de estos microorganismos son ácido láctico y diacetilo, compuestos que en concentraciones de 0.14 mg / L le proporcionan a la cerveza aroma y sabor diferente a los deseados (Hough, 1971).

Como ya se había mencionado, Campbell, 1987., reporta que las principales vías de infección en el proceso cervecero son el área de fermentación y la levadura de inóculo. Los procedimientos de sanidad aplicados en estas áreas son más estrictos que en otras partes del proceso, para tratar de mantener bajo control a los agentes contaminantes.

Para el saneamiento de la levadura de inóculo (Fowell, 1967), recomienda diferentes métodos de desinfección entre los que están; el uso de desinfectantes ácidos como los ácidos tartárico, propiónico, láctico que son ácidos orgánicos, o el uso de ácidos inorgánicos diluidos, como el ácido sulfúrico, clorhídrico o fosfórico.

La finalidad de uso de los agentes ácidos es de eliminar los microorganismos contaminantes por la acción del pH ácido tratando de no alterar las cualidades fisiológicas de la levadura. Los valores promedio de pH utilizados en la actualidad para desinfectar los inóculos fluctúan alrededor de 3.20. Los tiempos de exposición a la actividad bactericida del pH varían dependiendo de las necesidades. Un rango establecido es de 2 a 3 horas. ®

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Otros métodos aplicados para la sanidad de las levaduras son ; Agua caliente a una temperatura de 50° C, el tiempo de exposición dependerá de la carga bacteriana del inóculo. Las sales cuaternarias de amonio y sulfitos también son utilizados y su concentración dependerá de la carga bacteriana existente. El valor promedio de la concentración es de 35 mg/litro (Stanton, 1971).

La desinfección de las superficies que están en contacto con la cerveza se puede realizar con diferentes agentes químicos, entre ellos se puede mencionar a los compuestos clorados, iodóforos, ácidos y compuestos bromados.

El presente trabajo de investigación, pretende cubrir un aspecto muy importante en los procesos de fermentaciones alcohólicas; éste es, el efecto que se presenta sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos que son expuestos a la acción de agentes desinfectantes ácidos.

Para realizar los métodos de investigación que se han propuesto, es necesario que se conozcan aspectos tan importantes de los microorganismos cerveceros como son: fisiología y bioquímica, habitat, condiciones óptimas de crecimiento en un medio de cultivo determinado, morfología, etc. A continuación se describen algunas características de los organismos involucrados en el estudio y además se presentan algunas relaciones de estos gérmenes con algunos tipos de alimentos y las diferentes clases de alteraciones que pueden provocar en los mismos.

*Saccharomyces uvarum*, *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*, Se caracterizan por tener propiedades bioquímicas y fisiológicas en común; son anaerobios facultativos (Buchanan y Gibbons, 1980), crecen a valores de pH muy similares, algunos de ellos, como las levaduras, proporciona a los otros microorganismos, cofactores enzimáticos que son necesarios para su crecimiento (Kuines et. al., 1991), ésta es una de las principales razones por las cuales dichos microorganismos muchas veces se les encuentra en sociedad (Kennes et al., 1991).

#### 4.6.2 Generalidades sanitarias en otros tipos de alimentos

En las industrias de fermentación alcohólica, industria láctea, en los almacenes de granos de cereales y en otros procesos de elaboración de alimentos, con frecuencia se pueden ver relaciones de asociación de organismos (Frasier, 1973), algunos de ellos tienen efectos beneficioso para el proceso requerido, como en la fermentación de la salsa soja, salsa tamarí, miso etc., en los cuales se necesita de la actividad de bacterias lácticas y de una fermentación alcohólica por *S. rouxi*, para proporcionar las características organolépticas al producto (Frazier, 1973).

Pero otros en alguna etapa del proceso no son deseables, ya que pueden generar alteraciones en los productos finales y a la vez modificar la calidad de los mismos. Esto suele pasar en las fermentaciones alcohólicas, elaboración de quesos, y en algunos productos lácteos. Los tipos de microorganismos más frecuentemente encontrados en estos procesos son: Bacterias lácticas, levaduras, *Bacillus*, hongos y bacterias mesófilicas (Benjamin et al., 1964).

En la elaboración del vino, cerveza, yogur, en la fábrica de quesos, mantequilla, y en la elaboración de otros tipos de alimentos; la relación que hay entre algunos microorganismos es tan estrecha que la mayoría de las veces, es muy difícil separarlos de manera individual de los sistemas en los cuales están involucrados (Deaschel et al., 1988).

La necesidad de que las fermentaciones se realicen la mayoría de las veces con el dominio de alguno de los microorganismos de interés, es principalmente para mantener las características organolépticas de los productos (Tsau et al., 1992). La proliferación de microorganismos no deseados dentro de un proceso, altera las cualidades de un producto alimenticio como son: aroma, sabor, apariencia, textura, etc., (Tseng et al., 1991).

Debido a la problemática que se presenta para los procesos de fermentaciones industriales, de crear sistemas que permitan el desarrollo de cierto microorganismo en sus reactores, se sugieren algunas técnicas, que puedan ser útiles, y que por lo tanto permitan sólo el crecimiento del microorganismo de interés. Dentro de éstas se han mencionado: La aplicación de luz ultravioleta, el uso de antibióticos, altas temperaturas, sistemas de filtración etc. La característica de estos métodos es que no son selectivos (Quintero, 1990).

Modificaciones a las concentraciones de iones hidrógeno en sistemas biológicos cambian el comportamiento del mismo, así como también el número de microorganismos (Bailey y Ollis, 1986, Bobillo y Marshal, 1992). Tomando en consideración, que los microorganismos son un conjunto múltiple de enzimas, a las cuales los cambios de pH les provoca una alteración de la actividad y si éstos son muy drásticos, se presenta una pérdida completa de sus funciones biológicas, como consecuencia de la pérdida de actividad enzimática (Cholela y Keller, 1990).

Este efecto es debido a la pérdida de las estructuras secundarias y terciarias de estos compuestos.

Una alteración en las enzimas de los microorganismos, produce cambios en la cinética de crecimiento por lo tanto, cuando estos cambios se presentan en un sistema en donde se tiene diferentes géneros de bacterias y de levaduras, predominarán aquellos que están más preparados para resistir los efectos de los iones hidrógeno (Tseng, 1991).

Los aminoácidos que constituyen las proteínas tienen la capacidad de amortiguar a los iones hidrógeno, esto trae como consecuencia que, entre mayor sea el número de proteínas que se agrupen dentro de un organismo, mayor será su resistencia a los efectos del pH (Girud et al., 1991).

Así como las enzimas tienen grupos reactivos para con los iones hidrógeno, hay otros componentes dentro de los sistemas vivos que tienen la capacidad de reaccionar y/o neutralizar los efectos del pH ácido.

Por ejemplo los compuestos nitrogenados como la urea, los nucleótidos, purinas y pirimidinas etc. así como también algunos metabolitos que se producen durante la actividad bioquímica de los microorganismos (Laidler y Bunting, 1973).

Otra información que también se tomó en cuenta para la elaboración del proyecto, es la manera típica de agrupación de los diferentes organismos, esta formación que es característica de las diferentes clases de microorganismos que se conocen, permite que la difusión de los iones hidrógenos hacia el interior de las células, sea mayor en un tipo de microorganismos que en otros, así algunos organismos presentarán en un menor tiempo los efectos del pH ácido que otros (Alan, 1989).

Las agrupaciones más típicas conocidas son: cadenas largas, cadenas cortas, a pares, aislados, en racimos, en tetradas, forma micelial, en pseudomicelio, etc. (Buchanan y Gibbons, 1980).

Además también es importante saber que la morfología de los organismos puede tener alguna influencia para amortiguar los efectos adversos del ambiente sobre su crecimiento. Ejemplos de éstas son: forma bacilar, coco, cocobacilar, para el caso de las bacterias es lo más común. Para las levaduras se les encuentra de morfología esférica, ovalada, en forma de puro, formando pseudomicelio, etc. (Prescott y Dunn, 1962).

Dependiendo de las concentraciones de  $H^+$ , predominará, algún tipo de microorganismo (Bobillo y Marshal 1992., Pirt, 1975).

En la industria de alimentos, así como en la de fermentaciones alcohólicas, los métodos tradicionales de sanidad, muchas veces no son suficientes para eliminar contaminantes microbianos, por lo tanto no cumplen con la función para la cual se han diseñado.

Por otro lado la mayoría de las veces se requiere de procesos que sólo afecten a cierto tipo de organismos, y los métodos tradicionales no aseguran lo anterior (Bailey y Oills, 1986).

Si se establece una técnica adecuada para evaluar el efecto del pH sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos, es posible que se resuelvan algunos problemas que son comunes para la industria de fermentaciones alcohólicas.

Consiguiendo algunas ventajas sobre los métodos tradicionales; Por ejemplo, ser más selectivos en el proceso de inhibición del crecimiento de organismos, producir menos daños en los organismos de interés, no alterar las cualidades organolépticas del producto final (Frazier, 1973).

## 5. HIPOTESIS

El efecto que presentarán las modificaciones de pH, sobre el crecimiento de los microorganismos en estudio, será menor en levaduras, que el que se presente sobre los *Lactobacillus spp* y los *Pediococcus spp*.

Los tiempos de exposición a los cuales se someterán los microorganismos serán más efectivos a la inhibición del crecimiento, en aquellos en el que el contacto con las soluciones ácidas sea más prolongado y con los valores de pH más bajos. Se espera una respuesta selectiva de la acción del pH sobre la cinética de crecimiento de levaduras, *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*.

## 6. OBJETIVOS

- 1.- Aislar, conservar y clasificar *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*, a partir de muestras de fermentación, maduración y levadura de cosecha, tomadas del proceso cervicero.
- 2.- Elaboración de curvas de crecimiento estandar de *Lactobacillus spp*, de *Pediococcus spp* y de *Saccharomyces uvarum*.
- 3.- Evaluación de la cinética de crecimiento de las cepas en estudio después de ser expuestas a los diferentes valores de pH.
- 4.- Evaluación cuantitativa de los efectos bactericidas de los diferentes valores de pH sobre los microorganismos en estudio.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 DISEÑO DEI EXPERIMENTO**

El diseño del experimento se basa en la designación de muestras por medio de muestreo aleatorio.

#### **7.1.1 Muestras de pH**

Se tomaron valores de 2.00 a 3.00 con incrementos de 0.25; los valores arriba de 3.25 se descartan ya que a valores mayores que este pH no se presenta efecto de inhibición sobre los microorganismos a estudiar, el valor de 3.25 fué descartado por medio de muestreo aleatorio.

Los valores abajo de 1.75, se descartaron ya que a estos niveles de pH el efecto bactericida es de un cien por ciento sobre los microorganismos en estudio, el valor de pH igual a 1.75 también se descarta por muestreo aleatorio.

#### **7.1.2 Selección del tiempo de exposición**

La mayoría de los agentes desinfectantes y métodos de desinfección en la industria cervecera, se presentan con tiempos máximo de exposición al agente desinfectante de tres horas. En el diseño de este experimento se tomó este dato como tiempo máximo de exposición a los efectos del pH.

— La selección de los tiempos intermedios de exposición entre 0 y 3 horas, se realizó en este caso, por medio de muestreo aleatorio. Se tomó el rango de 30 minutos como límite entre exposición y exposición, hasta llegar a las tres horas para evaluar el efecto del pH sobre los microorganismos en estudio. Los otros valores de tiempo intermedio que se estimaron en la evaluación aleatoria fueron: 15, 45 y 60 minutos.

#### **7.1.3 Concentración de microorganismos**

El método de selección del número de microorganismos por mililitro de muestra a evaluar a los efectos del pH, se efectuó por medio de muestreo aleatorio, aquí se tomó en cuenta la concentración de los inóculos utilizados en las diferentes industrias de bebidas alcohólicas (4 a 30 millones de levaduras/ml), y también las concentraciones de microorganismos que se pueden presentar como contaminantes en los diferentes procesos, los cuales pueden variar desde 0 a  $10^8$  bacterias por mililitro de muestra.

Los números aleatorios evaluados para el diseño del experimento son de 0.1 a 32 millones, con subdivisiones de 0.1 en el rango de 0.1 a 0.9; de 1.0 en el rango de 1.0 a 9.0, y de 1.0 en el rango de 10 a 32 millones. Así en el proceso aleatorio de muestreo se obtuvieron los siguientes números para ser considerados como concentración de microorganismos por mililitro a ser expuestas a los efectos bactericidas del pH.

**400 ml, 4.0, 16.0 y 28.0 millones de microorganismos/ml**

## **7.2 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO**

### **7.2.1 Medio de cultivo para levadura (YMA)**

Se compone de los siguientes ingredientes; Extracto de levadura 3.0 g, Extracto de malta 3.0 g, Peptona de carne 5.0 g, Glucosa anhidra 60 g y agar bacteriológico 20 g se es necesario. Todos los ingredientes se calcularon para un litro de agua destilada. Este medio se esterilizó a 15 lbs de presión por 15 minutos. Los ingredientes que componen al medio fueron de marca Bioxon.

### **7.2.2 Medio de cultivo para *Lactobacillus* (UBA)**

El medio está constituido por los siguientes ingredientes: Extracto de levadura 6.1 g, Dextrosa anhidra 16.1 g, Leche peptonizada 15 g, Cerveza pasteurizada 250 ml, Jugo de tomate 12.1 g, Fosfato dipotásico 0.31 g, Fosfato monopotásico 0.31 g, Sulfato de magnesio 0.12 g, Cloruro de sodio 0.006 g, Sulfato ferroso 0.006 g, Sulfato de manganeso 0.006 g, Agar bacteriológico 12 g, si se requiere. El medio fué aforado a 1000 mls. con agua destilada. Se esterilizó a 15 lbs de presión por 15 minutos. El pH final del medio de cultivo debe de ser de 6.1 a 6.5 a temperatura de 25° C. Los ingredientes del medio fueron de la marca Bioxon.

### **7.2.3 Medio de cultivo para *Pedococcus***

El medio de cultivo se compone de los siguientes ingredientes; Extracto de levadura 7.5 g, Leche peptonizada 7.5 g, Glucosa anhidra 7.5 g, Fosfato monopotásico 2.0 g, jugo de tomate 100 ml, Tween 80 0.1 g, L-Cisteina-HCl 1.0 g, si es necesario se le adiciona 20 g de agar. El medio se aforó a 1000 mls con agua destilada y se esterilizó a 15 lbs de presión por 15 minutos. El pH final del medio es de 5.1 a 5.33 a temperatura de 25° C. Los ingredientes que componen al medio fueron de la marca Bioxon.

## 7.3 OBTENCION DE MICROORGANISMOS

### 7.3.1 *Saccharomyces uvarum*

La cepa *Saccharomyces uvarum* es originaria de los laboratorios Jorgensen de Dinamarca. Esta cepa se conservó en tubos con agar inclinado, haciendo resiembra de la misma cada mes en el medio de cultivo YMA (Difco Manual, 1992), y después se puso en refrigeración, hasta que se terminaron las pruebas de evaluación.

Las resiembras se hicieron en un número de tubos tal, que se fueron tomando del refrigerador cada vez que se fué requiriendo durante la prueba.

Las levaduras antes de pasar a las pruebas debieron de ser analizadas microbiológicamente para descartar una posible contaminación por hongos y bacterias.

### 7.3.2 *Lactobacillus spp*

Estos microorganismos fueron aislados de las diferentes etapas del proceso cervecero (Levadura de inóculo, Fermentación, Area de maduración etc.), utilizando la siembra en placa por agitación, el medio de cultivo utilizado para este fin fué el Universal Beer Agar (UBA); este medio, cumple con los requisitos nutricionales necesarios para que se desarrollen bien los *Lactobacillus spp*.

Para los fines de la investigación, no es necesario que se conozca la especie de las bacterias, ya que se considera que el efecto de inhibición del crecimiento que presenta el pH sobre estos microorganismos, en general es el mismo para todas las especies (Gilliland y Rich, 1990).

La metodología utilizada para llegar al género de la bacteria, se basó en la selectividad del medio de cultivo UBA (Difco Manual, 1992), el cual debido a su composición química permite el crecimiento de las bacterias lácticas, entre ellas al los *Lactobacillus*, los que se distinguen por crecer en este medio de cultivo con las siguientes características morfológicas de las colonias.

Las colonias de *Lactobacillus* son blancas, pequeñas y húmedas. Para confirmar el género de la bacteria, a partir de las colonias típicas, se tomaron muestras para hacer

frotis y teñilo con la técnica gram, al analizarlo al microscópio de campo claro, se observaron bastones largos gram positivos agrupados en cadenas cortas.

Por microscopía de contraste de fase en las preparaciones frescas se observaron bacterias con forma de baston largo, agrupados a pares y en cadenas cortas siendo ésta la morfología típica del género *Lactobacillus*. Se hizo también la prueba de la catalasa con las colonias típicas de la bacteria, resultando negativa para los *Lactobacillus* (Rose, 1985). Se aislaron tres cepas de este género de microorganismos.

El método de conservación de esta bacteria fué el de tubos con medio de cultivo UBA inclinado, con su respectiva siembra por estría en superficie y almacenándose en refrigeración a temperatura de 4<sup>o</sup> C. El proceso se repitió cada siete días. Las cepas fueron revisadas antes de su uso, para descartar posibles fuentes de contaminación externa.

### 7.3.3 *Pediococcus spp*

Los *Pediococcus spp* al igual que los *Lactobacillus spp*, fueron aislados del proceso cervicero en sus diferentes etapas ya descritas. El medio de cultivo que se utilizó para los procesos de aislamiento se le conoce como medio de cultivo para *Pediococcus* (American Type Culture Collection Handbook of Bacteriology 1992).

Para efectos de la investigación, también en este caso, no fué necesario que se conociera la especie de estas bacterias, ya que la acción del pH sobre los microorganismos es el mismo para toda la familia (Visuri y Kirsop, 1970).

Se aislaron tres cepas de *Pediococcus spp*, los cuales se diferenciaron en el medio de cultivo por las características de las colonias que crecieron en el mismo: colonias grandes, en forma de disco, color blanco, húmedas y brillantes. Se prepararon frotis para realizar las observaciones al microscopio; en la tinción de gram, se observaron cocos agrupados a pares y en tetradas, gram positivos; en la microscopía de contraste de fase y campo oscuro se confirmó la morfología del microorganismo, la prueba de la catalasa dió negativa. La técnica de aislamiento aplicada, fué la de siembra en placa por agitación y de ahí se seleccionaron las colonias, para posteriormente ser analizadas.

La conservación de las cepas se realizó en tubos con medio de cultivo para *Pediococcus* con agar (agar inclinado), la siembra se hizo en la superficie del medio de cultivo, posterior al período de la incubación, estas cepas se guardaron en refrigeración a no más de 4<sup>o</sup> C, con su respectiva resiembra cada siete días.

La cepas de *Pediococcus spp*, antes de su uso, se analizó microbiológicamente para descartar contaminación externa.

#### 7.4 CINETICA DE CRECIMIENTO

*Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*: Se puede presentar la dificultad de conteo de colonias si se utiliza el método de cuenta viable para este fin, por lo tanto se procedió a elaborar una curva de calibración, la cual nos ayudó a obtener números de bacterias por ml. La curva se elaboró de acuerdo al nefelómetro de Mc Farland. Las lecturas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro Varian modelo DMS 80 uv-vis, seleccionando una longitud de onda de 550 nm. (Food and Drug Administration Bureau of Foods 1978).

En la elaboración de la curva de crecimiento para la levadura, la metodología fué diferente ya que aquí, se hicieron lecturas del número de células al microscopio utilizando una cámara de Neubauer (PROPPER LUMICYTE), la cual está ajustada en su volumen para obtener datos del número de células por ml. Para realizar el conteo de células, se utilizó un microscopio de campo claro (Zeiss mod. 473415-9901), utilizando el objetivo seco de 40X. Se hicieron diluciones 1:10 en solución salina al 0.85% a partir de las muestras, cada vez que se requirió (Lynch et al., 1969).

#### 7.5 PREPARACION DEL NEFELOMETRO DE Mc FARLAND

El nefelómetro se elaboró de acuerdo a la siguiente tabla, haciéndose lecturas a 550 nm en un espectrofotómetro VARIAN mod. DMS80 UV-Visible.

Número de tubo	ml de BaCl <sub>2</sub> al 1 %	ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1 %	Número de Bacterias por ml X 10 <sup>8</sup>
1	1	99	3.00
2	2	98	6.00
3	3	97	9.00
4	4	96	12.00
5	5	95	15.00
6	6	94	18.00
7	7	93	21.00
8	8	92	24.00
9	9	91	27.00
10	10	90	30.00

Los reactivos que se utilizaron para la elaboración de la curva son grado analítico.

## **7.6 PREPARACION DE MATERIAL Y DE REACTIVOS PARA LA PRUEBA**

El material que se utilizó en la evaluación de los efectos del pH sobre el crecimiento de los microorganismos se compone principalmente de cajas de petri, matraces erlenmeyer de 125 ml, de 500 mls y de 1000 mls, pipetas serológicas de 1.0, 5.0 y 10 mls, tubos de ensayo de 18 x 150 mm, cubre objetos, portaobjetos.

Todo el material de vidrio al igual que los medios de cultivo, solución salina al 0.85 %, se esterilizó a 15 libras de presión por 15 minutos en una autoclave (MARKET FORGET mod. Sterilmatic).

Las soluciones de pH con sus diferentes valores se prepararon con ácido fosfórico concentrado grado alimenticio, y se esterilizó por filtración a través de membrana millipore con un tamaño de poro de 0.45 micrómetros. El pH de las soluciones se confirmó en un potenciómetro (CORNING mod. pHmeter 125). Los valores obtenidos son 2.00, 2.25, 2.50, 2.75, y 3.00.

## **7.7 METODO**

Las cepas de microorganismos a evaluar se reactivaron en sus respectivos medios de cultivo; en el caso de los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*, se utilizaron cultivos con una edad de 24 horas, a partir de la muestra original se hicieron diluciones 1:10 en solución salina estéril para obtener el número de bacterias deseadas en la prueba.

Para la levadura, se realizaron una serie de propagaciones, hasta obtener un volumen suficiente de muestra para hacer los análisis; al igual que las bacterias, también se le hicieron diluciones 1:10 hasta obtener el número de microorganismos deseados.

La concentración de microorganismos a evaluar fué diseñada por medio de muestreo aleatorio, siendo los resultados seleccionados los siguientes.

**0.4, 4.0, 16.0, 28.0 millones de microorganismos por mililitro**

De las muestras activadas, se hicieron una serie de tres lavados con solución salina estéril, centrifugar en cada lavado en una centrífuga (CLAY ADAMS mod. Dynac II). A 3000 rpm por 15 min., a partir de aquí, se hicieron las diluciones necesarias para llegar al número de microorganismos deseado.

### **7.7.1 EXPOSICION DE LOS MICROORGANISMOS A LOS EFECTOS DEL pH**

Para evitar contaminaciones del ambiente, las pruebas se realizaron en una campana de flujo laminar (STERIL GARD HOOD). En matraces erlenmeyer de 125 ml se colocaron las soluciones con los diferentes valores de pH en un volumen de 50 ml, a estas soluciones se añadieron los microorganismos en sus respectivas concentraciones y se les midió el tiempo de exposición ( 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos ).

Después de cada tiempo establecido, se tomaron muestras de los matraces que contenían a los microorganismos expuestos a los efectos del pH, para realizar los siguientes análisis:

a) Siembra en placa para hacer una cuenta viable del número de microorganismos que permanecieron viables después de la exposición a los efectos del pH a los diferentes tiempos establecidos.

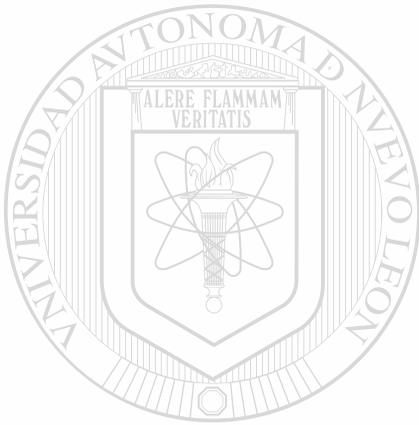
Se tomó un mililitro de la muestra, se hicieron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , etc., y se colocó un mililitro de la dilución en una caja de petri estéril, se le añadió el medio de cultivo correspondiente a una temperatura de 45 grados centígrados aprox., se mezcló por agitación y se dejó solidificar. Después se llevó a período de incubación en una incubadora (FELIZA mod. 1027), por 72 horas a temperatura de 35 grados centígrados, posteriormente se hicieron lecturas del número de colonias en un DARKFIELD QUEBEC COLONY COUNTER mod. RE-3215., al final se reportó el número de microorganismos por mililitro de muestra.

b) Se tomó un mililitro de las muestras expuestas a los efectos del pH, se inoculó en los medios de cultivos líquidos de cada microorganismo a evaluar, para posteriormente seguir la cinética de crecimiento de los mismos.

La prueba se realizó en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con tapón de rosca, este recipiente contenía 15 mililitros de medio de cultivo líquido estéril, al cual se le adicionó el volumen de muestra a analizar, y posteriormenete se llevó a incubación a una temperatura de 35 grados centígrados en una incubadora (FELIZA mod. 1027). Para el caso de *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* , se tomaron muestras cada doce horas y se realizaron lecturas al espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

La levadura se analizó cada veinticuatro horas y las lecturas se hicieron en la cámara de Neubauer. Se tomó un mililitro de muestra, se hicieron diluciones necesarias, se colocó un pequeño volumen de muestra en la cámara (0.00025 mm cúbico), y se realizó el conteo al microscopio de campo claro (ZEISS mod. 473415-9901), con el objetivo de 40 X.

En el caso de las muestras con diluciones, se tomó el factor de dilución en cuenta para hacer los cálculos (por norma general se hace dilución 1:10, y el número de células por mililitro de muestra, se obtuvo al dividir el dato entre dos), si el conteo fué directo de la muestra se multiplicó el dato por cincuenta mil y se obtuvo el número de levaduras por mililitro de muestra. El área de la cámara de Neubauer que se utilizó para los conteos de levaduras en este caso fué de 80/400 mm<sup>2</sup>, haciendo los cálculos correspondientes, se obtuvieron los factores constantes para realizar la determinación del número de células por mililitro de muestra (2 y 50,000), (M, J. Lynch et. al., 1969).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

### 8.1 RESULTADOS DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

Se reportan las cinéticas de crecimiento estandar obtenidas para *Saccharomyces uvarum*, *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*, así como la curva de calibración que se preparó con la ayuda del nefelómetro, para obtener el número de bacterias totales por mililitro de muestra.

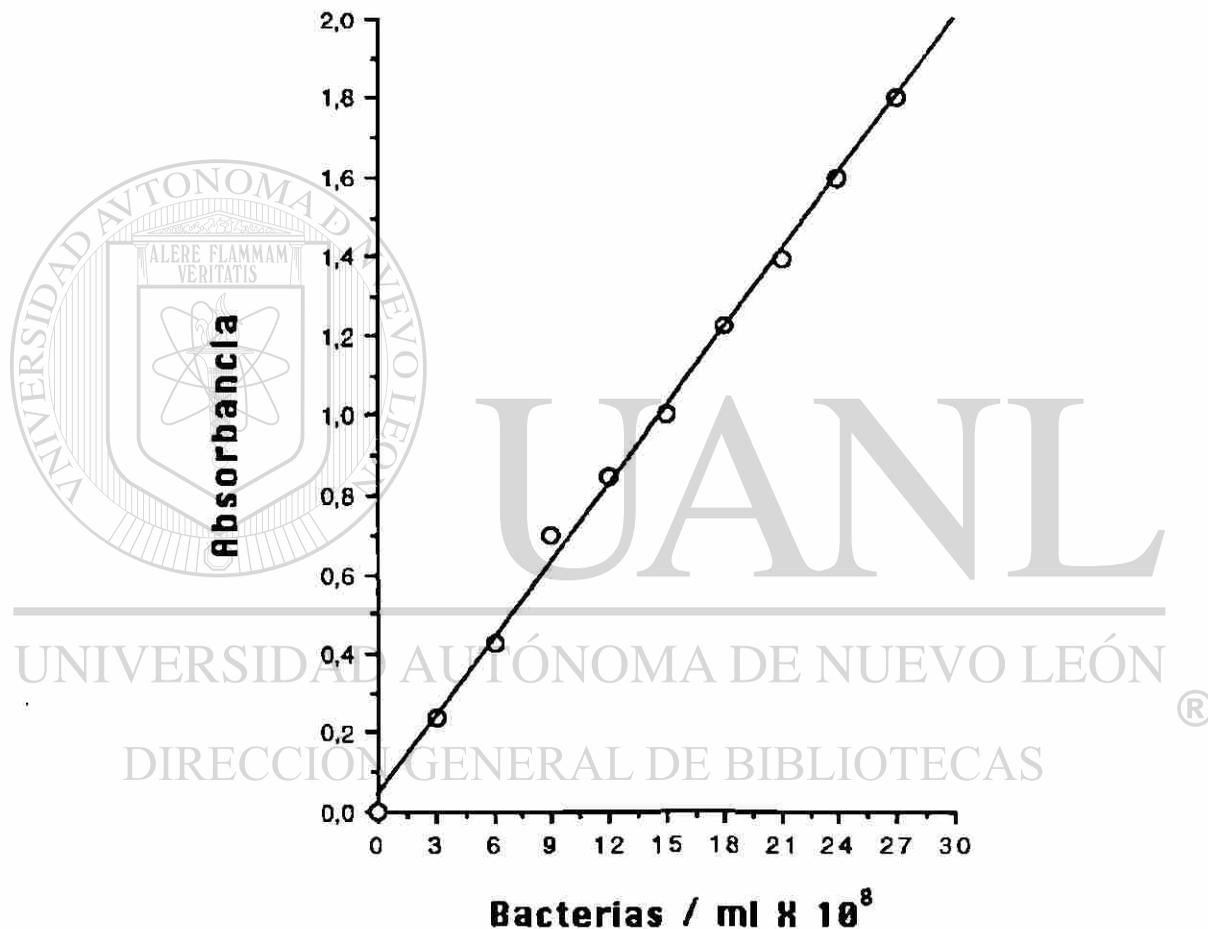


Figura No 1 Curva de calibración para determinar turbidez o el número de microorganismos/ml para *Pediococcus spp* y *Lactobacillus spp*.

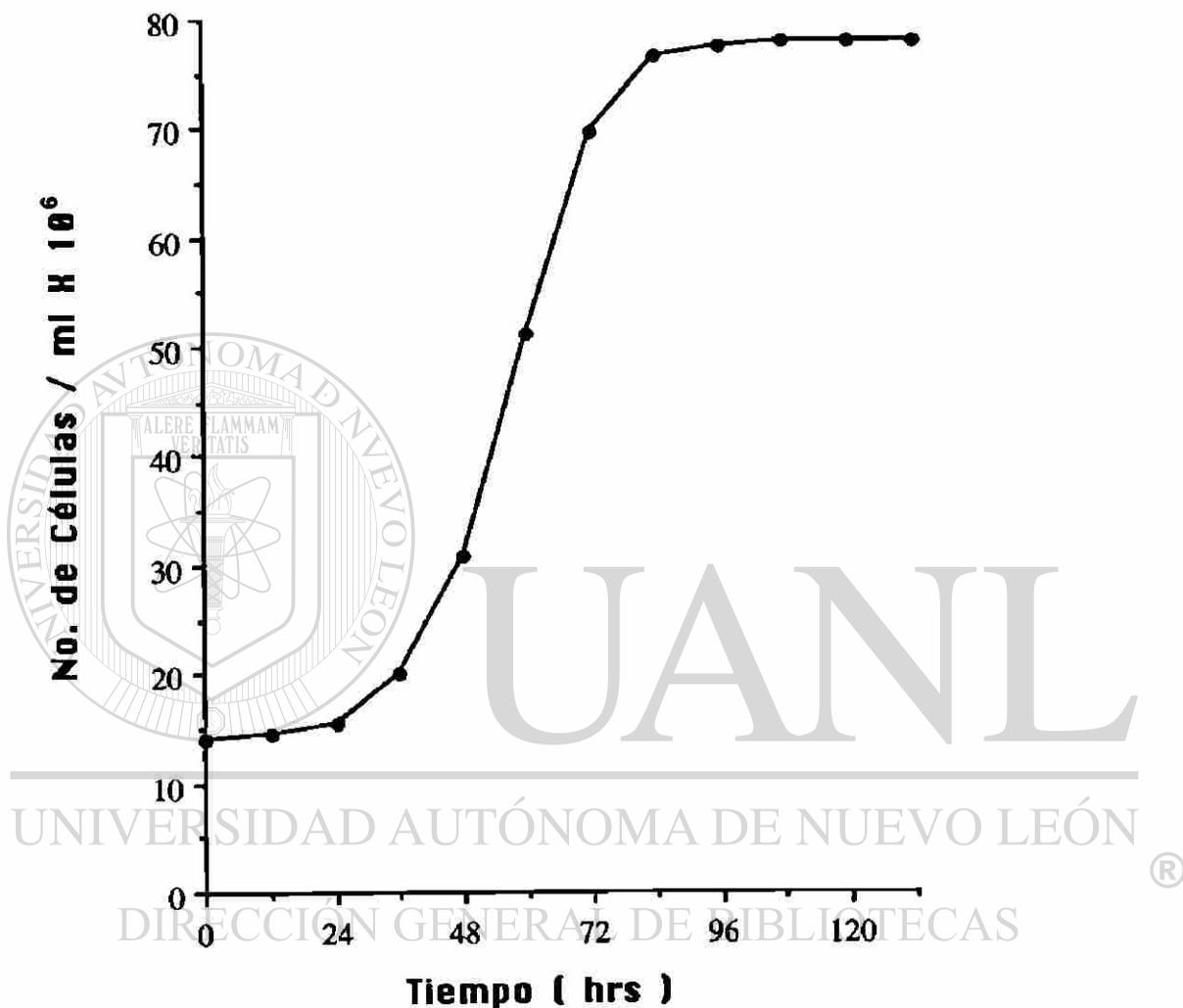
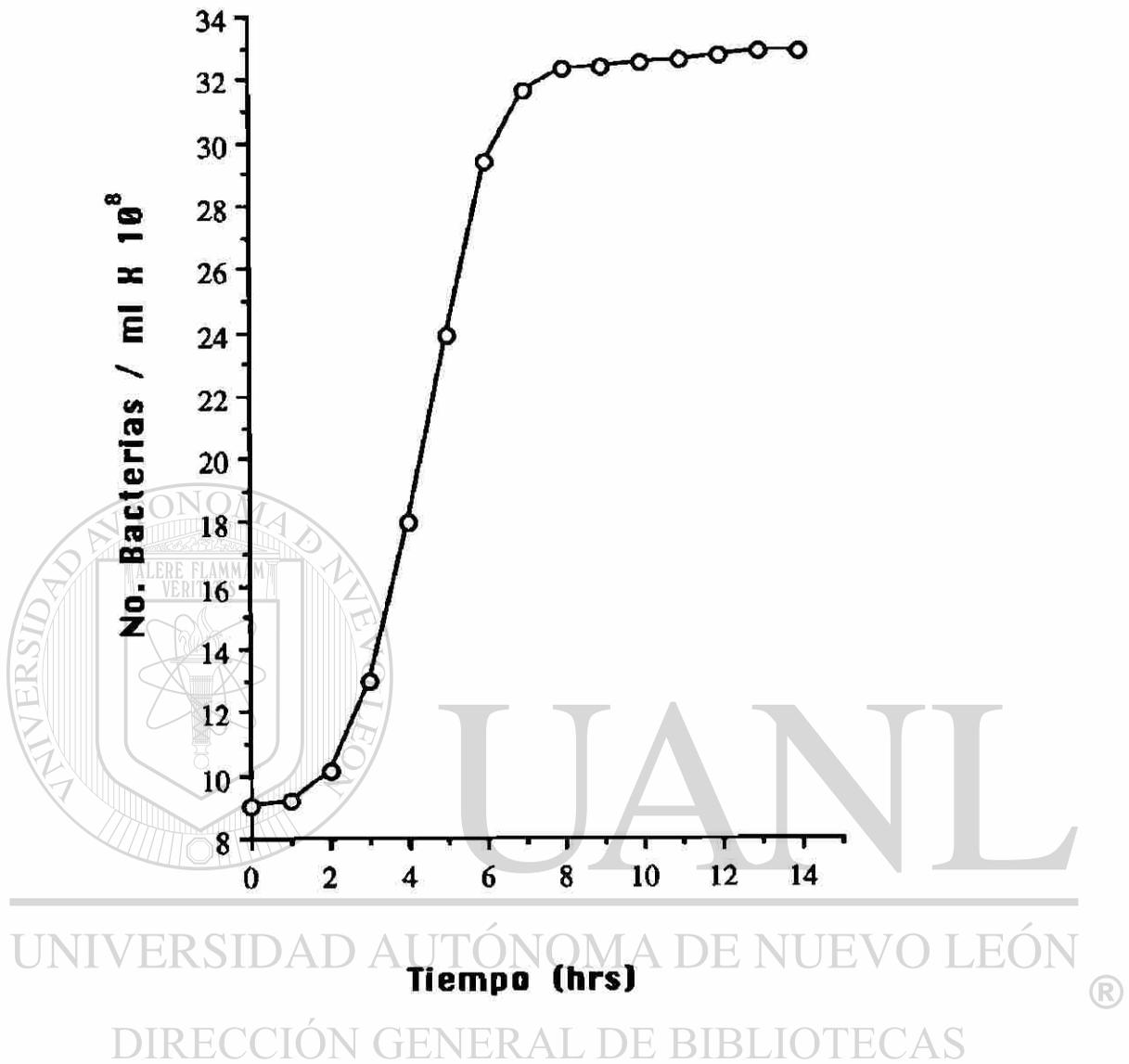


Figura No 2 Curva de crecimiento de *Saccharomyces uvarum* en la cual se calcularon  $T_d = 18.45$  hrs., Fase de adaptación de 24 hrs., y una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.0346.



**Figura No 3** Curva de crecimiento de *Pedlococcus* spp en la cual se determinaron los siguientes parámetros:  $T_d = 2.50$  hrs., Fase de adaptación de 1 hrs., y una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.277.

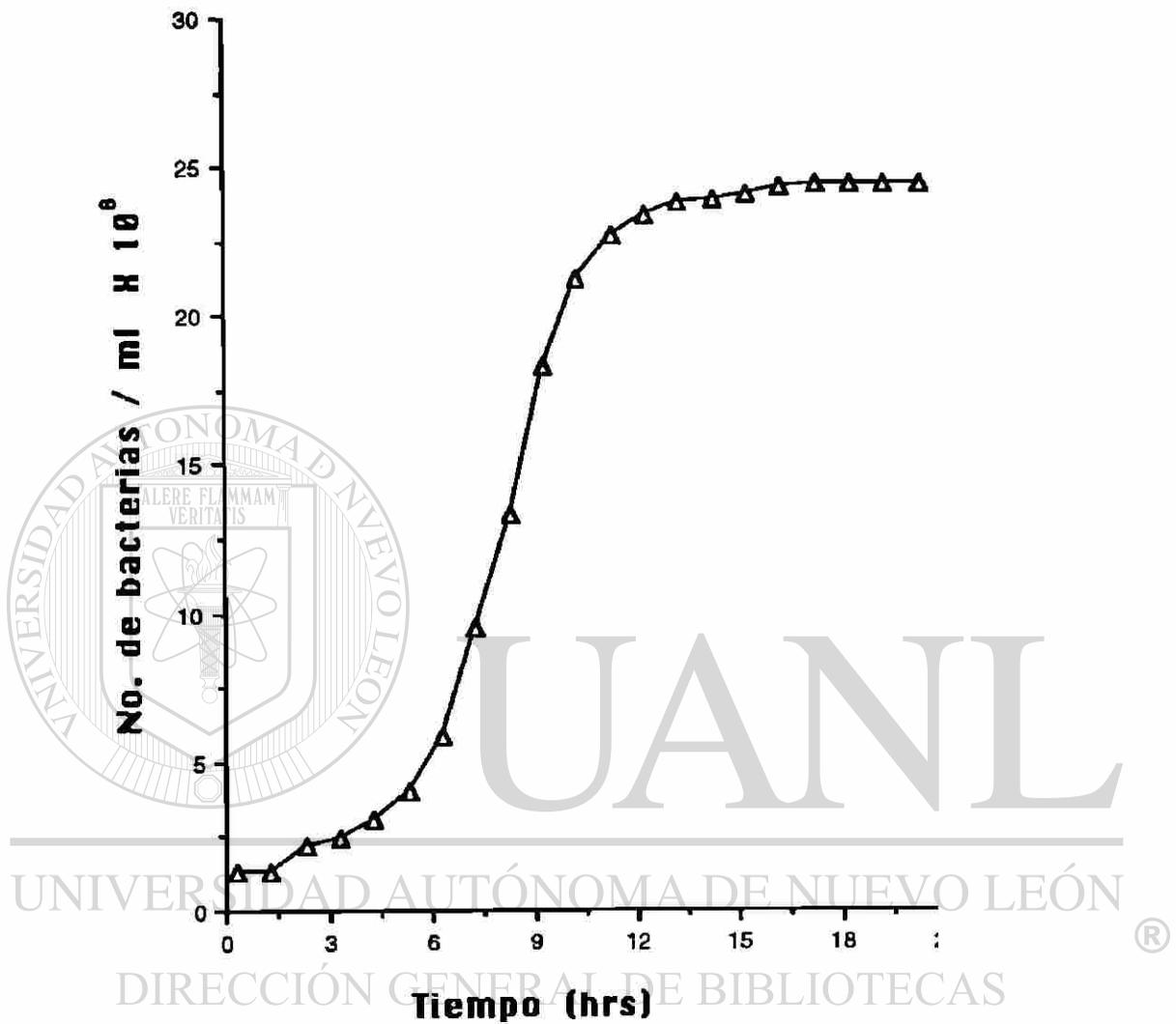


Figura No 4 Curva de crecimiento de *Lactobacillus* spp en la cual se determinaron los siguientes parámetros Td = 2.122 hrs., Fase de adaptación de 3 hrs y tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.301.

## 8.2 RESULTADOS DE LOS EFECTOS DEL pH SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

### 8.2.1 Resultados a los treinta minutos de exposición.

Las Figuras 5,6,7 y 8 representan los resultados obtenidos con los diferentes valores de pH y concentraciones de gérmenes, a los treinta minutos de exposición.

Al revisar los datos reportados en las gráficas, se puede observar que las bajas concentraciones de biomasa (400 mil y 4 millones/ml), son muy susceptibles a los efectos bactericidas del pH, de tal forma que, a los primeros 30 minutos de exposición a la acción del pH, los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* no presentaron cinética (pH de 2.00 y 2.25). A valores de pH de 3.00 y 2.75, a pesar de que las bacterias son eliminadas en un 99 por ciento, al realizar la cinética de crecimiento de las mismas, a partir de las muestras en estudio, se logró una recuperación de los gérmenes de hasta  $10^8$  microorganismos/ml, después de un período de adaptación largo, con la obtención de un incremento de la tasa de crecimiento de ambas bacterias.

A las concentraciones de 16 y 18 millones de microorganismos/ml el efecto del pH sobre los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* es reversible ya que a pesar de que las cuentas viables que se obtienen a los 30 min de exposición son bajas los gérmenes se recuperan. Esto se puede observar en los datos de la cinética de crecimiento (tasa de crecimiento) de estos microorganismos.

Los *Lactobacillus spp* son más sensibles que los *Pediococcus spp* a los valores de pH bajos según se puede ver en los resultados reportados.

Para la *Saccharomyces uvarum* a la concentración de 400 mil/ml se ve afectada la fase de adaptación y el tiempo de duplicación, pero en general la levadura se recupera de los efectos del pH más rápidamente que las bacterias. A las otras concentraciones de levadura utilizadas, realmente no se presenta retraso en la fase de adaptación al medio de cultivo. Ni a 16 y 28 millones de levaduras por ml.

Los valores de pH que afectan a la levadura en su fase de adaptación y su tiempo de duplicación son: 2.00 y 2.25.

### 8.2.2 Resultados a los 60 minutos de exposición.

Las Figuras 9, 10, 11 y 12 corresponden a los efectos del pH sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos en estudio a sus diferentes concentraciones valores de pH y tiempos de exposición.

Al incrementarse el tiempo de exposición de los gérmenes a los efectos del pH ácido, el crecimiento de los mismos se modifica, principalmente a bajas concentraciones de microorganismos en donde el efecto bactericida es total y sin que se presente una reactivación de *Lactobacillus spp* ni de *Pediococcus spp*: se está hablando de 400 mil y 4 millones de organismos por ml y a valores de 2.00 y 2.25 de pH respectivamente. Como en los análisis anteriores, el crecimiento de los *Lactobacillus spp* fué más afectado que la de *Pediococcus spp* bajo estas condiciones de evaluación.

A las concentraciones 16 y 28 millones de microorganismos/ml, a pesar de las cuentas viables bajas obtenidas tanto de *Lactobacillus spp*, así como de *Pediococcus spp*, estos microorganismos lograron presentar un proceso de reactivación, sobre todo a los valores de pH de 2.00 y 2.25, en donde sobresale el crecimiento de los *Pediococcus spp*.

*Saccharomyces uvarum*; al igual que en los análisis anteriores se ve afectada en su fase de adaptación y en su tiempo de duplicación a valores de pH de 2.00, y 2.25 y a concentraciones bajas de levadura evaluada. A concentraciones mayores, no hay alteración en la curva de crecimiento de *Saccharomyces uvarum*.

### 8.2.3 Resultados a los 90 minutos de exposición

La evaluación del efecto del pH ácido sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos a 90 min. de exposición se representan en las Figuras 13, 14, 15 y 16 que contienen los datos obtenidos a este tiempo de exposición a los diferentes valores de pH y concentraciones de microorganismos.

El estudio de estos datos nos revela que el efecto bactericida del pH se incrementa con respecto al tiempo, de tal manera, que para las cargas microbianas de 400 mil y 4 millones de organismos por ml, el efecto del pH, desde 2.00 a 2.50 es letal, ya que no se presenta en ningún momento efecto de reactivación para ninguna de las bacterias en estudio (*Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*). A las concentraciones mayores como lo son 16 y 28 millones de microorganismos/ml, la carga microbiana disminuye en su cuenta viable, pero se presenta de nuevo un proceso de reactivación de las bacterias en cuestión,

principalmente a pH de 2.75 y pH de 3.00 no hay alteración, pudiéndose evaluar la curva de crecimiento de cada microorganismo.

Para *Saccharomyces uvarum*, se incrementa la fase de adaptación y el tiempo de duplicación y disminuye la tasa de crecimiento, al incrementar el tiempo de exposición sobre todo a bajas concentraciones de levadura y a valores de pH de 2.00 y 2.25 aún así, se pudieron obtener curvas de crecimiento bien establecidas para la levadura.

A las concentraciones 16 y 28 millones de levaduras/ml, no se presentó ningún problema en la cinética de crecimiento.

#### 8.2.4 Resultados a los 120 minutos de exposición

Las Figuras 17, 18, 19 y 20 nos proporcionan la información que se generó a este tiempo de exposición (120 min ).

La información que se obtiene a partir de los resultados es semejante a la de los 90 min. de exposición, sólo que aquí se incrementa un poco más el efecto bactericida del pH. Para los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* a la concentración de 400 mil organismos por ml, el efecto biocida del pH ácido incrementa aún a 2.75.

A 4 millones de microorganismos/ml a este valor de pH (2.75) se obtienen cuentas viables bajas, aún así, se presenta una curva de crecimiento tanto para *Lactobacillus spp*, así como para *Pediococcus spp*.

---

Lo cual sugiere que se presentó un fenómeno de reactivación.

A las concentraciones de 16 y 28 millones de microorganismos por ml, el efecto del pH 2.00 y 2.25 a este tiempo de exposición son letales en un cien por ciento, sobretodo para los *Lactobacillus spp* al cual no se le pudo determinar una curva de crecimiento.

*Pediococcus spp* a la concentración de 28 millones, presenta un fenómeno de reactivación a pesar de las cuentas viables bajas que se obtienen a este tiempo de exposición.

*Saccharomyces uvarum* al igual que los tiempos de exposición analizados anteriormente; a valores de pH de 2.00 y 2.25, se le ve afectada en su fase de adaptación y en su tiempo de duplicación. A las concentraciones de 16 y 28 millones de levaduras/ml no se presenta ningún problema en el crecimiento.

## 8.2.5 Resultados a los 150 y 180 minutos de exposición

El análisis de resultados para los tiempos de exposición restantes (150 y 180 minutos) se realiza de una manera conjunta ya que los resultados son muy semejantes y a la vez éstos tienen semejanza con los datos de la exposición a 120 minutos.

A estos tiempos de exposición (150 y 180 min), las concentraciones bajas de bacterias son destruidas por la acción del pH desde 2.00 a 2.75, sin que se presente un proceso de reactivación según se puede observar en las *figuras 21 a la 28* .

A las concentraciones mayores de biomasa (16 y 28 millones de microorganismos/ml), los *Lactobacillus spp* son eliminados en su totalidad a los valores de pH de 2.00 y 2.25., a los otros valores de pH, se presenta un fenómeno de reactivación y por lo tanto se realiza muy bien la curva de crecimiento de esta bacteria. Los *Pediococcus spp* a la concentración de 16 millones por ml presenta un proceso de reactivación principalmente a los valores de pH de 2.50 a 2.75 y a la concentración de 28 millones/ml en todos los valores de iones hidrógeno se presenta este proceso de reactivación.

Para *Saccharomyces uvarum* el resultado de los efectos del pH, a las diferentes concentraciones de levaduras utilizadas, es el mismo para cada concentración en particular a cada tiempo de exposición.

A concentraciones bajas de levadura, se ve afectada en la fase de adaptación y el tiempo de duplicación, pero de todas maneras se realiza un crecimiento bien definido. A concentraciones mayores, el comportamiento cinético de la levadura es normal, como se puede observar en los datos reportados en las figuras.

Para redondear el análisis de los resultados del efecto del pH ácido sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos cerveceros; es importante observar que los valores de pH de 2.00, 2.25 y 2.50 son los que más alteran el comportamiento de crecimiento de las bacterias, llegando en la mayoría de los casos a eliminar por completo a las mismas y por lo tanto también su tasa de crecimiento.

Con la excepción de *Pediococcus spp* que a la concentración de 28 millones de microorganismos/ml, logró soportar los efectos biocidas del pH inclusive hasta los 180 minutos de exposición.

La tasa de crecimiento, como se comenta anteriormente, se ve afectada en las bacterias lácticas. *Saccharomyces uvarum*, se afectó en las etapas de adaptación y tiempo de duplicación, manteniendo constante la tasa de crecimiento.

### **8.3 RESULTADOS DE LA EFECTIVIDAD BACTERICIDA DEL pH SOBRE LOS MICROORGANISMOS**

#### **8.3.1 Concentración de $4.0 \times 10^5$ microorganismos/ml litro**

El análisis de las figuras las cuales reportan los datos que nos proporcionó la cuenta viable de los gérmenes en cuestión, se puede ver que las concentraciones bajas de microorganismos/ml utilizados  $4.0 \times 10^5$ , son las más afectadas. Por ejemplo en las *figuras 29 a la 33* en las cuales se hace la comparación del efecto bactericida de los diferentes valores de pH utilizados en las pruebas, se puede observar que los *Lactobacillus spp* hasta el pH 2.75 a los 30 minutos de exposición de la cuenta viable es de cero bacterias/ml, lo cual implica que concentraciones menores de  $4.0 \times 10^5$  son susceptibles a ser eliminadas por la acción de ese valor de pH a un tiempo de exposición de 30 minutos como máximo.

Los *Pediococcus spp* presentaron un poco más de resistencia a el efecto bactericida de los diferentes valores de pH usados en la prueba, si se les compara con los *Lactobacillus spp*, ya a que los valores de 2.75 y 3.00 no fueron capaces de eliminar en forma total a este microorganismo a la concentración de  $4.0 \times 10^5$  / ml, para *Saccharomyces uvarum*, las cuentas viables obtenidas se mantienen constantes durante la evaluación de la prueba, ésto es indicativo de que la levadura es más resistente a la actividad bactericida del pH ácido, a la concentración evaluada.

Al final de los 180 minutos de exposición de los microorganismos a los valores de pH seleccionados, se sacó el porcentaje de efectividad siendo este:

A pH de 2.00, 2.25 y 2.50 a los primeros 30 minutos de exposición el porcentaje de efectividad biocida fué de 100 % para *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*, la levadura sólo presento alteración en su curva de crecimiento (fase de adaptación y tiempo de duplicación).

A pH de 2.75, los primeros 30 min. de exposición presentaron hasta un 99.9 por ciento de efectividad biocida, sólo hasta los 120 min. fué cuando se logró el 100% de destrucción de los microorganismos.

pH de 3.00 a los 30 min. de exposición de las diferentes concentraciones de microorganismos se logró una efectividad de 99 %, sin embargo no se logró el 100 % de efectividad biocida al tiempo máximo de exposición. Es importante aclarar que en cada etapa de la prueba en donde no se logró el 100 por ciento de destrucción, se obtuvieron curvas de crecimiento de los microorganismos en estudio, ésto habla de un fenómeno de reactivación por parte de los microbios.

### 8.3.2 Concentración de $4.0 \times 10^6$ microorganismos por mililitro

Al incrementar la concentración de microorganismos en las pruebas, la capacidad bactericida del pH disminuye. Las figuras 34 a la 38 Corresponden a los diferentes resultados de cuenta viable obtenidos a la concentración de  $4.0 \times 10^6$  bacterias por mililitro expuestos a los diferentes valores de pH y tiempos de exposición.

Los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* a pH de 2.50 no son destruidos totalmente a los treinta minutos de exposición, como había ocurrido en la concentración anterior. Aunque en una proporción muy baja, se obtuvieron cuentas viables de 20 bacterias/ml para *pediococcus spp* y 12 para *Lactobacillus spp*, ésto ayudó a que se pudiera seguir una cinética de crecimiento de los microorganismos que resistieron los efectos del pH a los 30 min. de exposición.

Las levaduras no se ven alteradas en la cuenta viable por los efectos del pH ácido, pero en la cinética de crecimiento, la fase de adaptación tiene un retraso. Esto es indicativo de que la levadura fué expuesta a situaciones de estrés.

El análisis de las concentraciones  $4.0 \times 10^6$  microorganismos/ml a los diferentes valores de pH y tiempos de exposición, nos muestra que los *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp* a los valores de 2.75 y 3.00 no son eliminados totalmente, aunque las cuentas viables para cada bacteria son muy bajas en relación al número con el cual se empezó la prueba ( $4.0 \times 10^6$ ), siendo un porcentaje mínimo de células vivas el que se obtiene en cada tiempo de exposición evaluado. Aún así, se pudo realizar cinéticas de crecimiento para cada microorganismo.

A las concentraciones  $4.0 \times 10^6$  microorganismos/ml, el análisis cuantitativo, nos muestra que al incrementar la biomasa, el efecto biocida del pH disminuye por ejemplo:

Los valores de pH de 2.00 y 2.25 presentan el mismo porcentaje de efectividad (100 %) a 30 min. de exposición, pero al pH de 2.50, se tuvo que alargar el tiempo de exposición hasta 90 min. para lograr el 100 % de efectividad biocida. En el pH de 2.75 pasó lo mismo, ya que se tuvo que incrementar el tiempo de exposición para lograr el 100 por ciento de efectividad. Esta comparación es en relación a la concentración anterior ( $4.0 \times 10^5$ ).

El análisis cuantitativo de la efectividad biocida del pH de 3.00, muestra un comportamiento de disminución de la efectividad desinfectante a los primeros 30 min., el porcentaje de efectividad logrado fué en promedio de 80 %, al ir aumentando el tiempo de

exposición, este valor se incrementa hasta llegar a 98 % aproximadamente. Al igual que en las pruebas anteriores, en donde las cuentas viables fueron muy bajas, se pudo evaluar una curva de crecimiento para cada microorganismo. La levadura no presentó alteración ya que el porcentaje de células destruidas fué de cero.

#### 8.3.4 Concentración de $16.0 \times 10^6$ microorganismos por mililitro

Las figuras de la 39 a la 43 nos proporciona el siguiente análisis. El comportamiento de los *Pediococcus spp* a los efectos del pH ácido a los diferentes tiempos de exposición y a la concentración de  $16.0 \times 10^6$  microorganismos por mililitro. A los treinta minutos de exposición, los *Pediococcus spp* en su cuenta viable presentaron un número de 3 bacterias/ml, conforme se incrementó el tiempo (90 min) los valores de pH de 2.00 y 2.25, fueron bactericidas cien por ciento. Los valores de 2.50, 2.75 y 3.00 no son totalmente efectivos ya que aparte de obtener cuentas viables arriba de 1000 bacterias/ml, se pudieron evaluar cinéticas de crecimiento.

El género *Lactobacillus spp* fué más afectado que *Pediococcus spp* ya que a los valores de pH de 2.00 y 2.25, las bacterias son eliminadas totalmente a los 30 minutos de exposición, según se aprecia en el dato de la cuenta viable, el cual es de cero bacterias/ml para ambos casos.

Los otros valores de pH evaluados para *Lactobacillus spp* a  $16.0 \times 10^6$  microorganismos por mililitro no mostraron efecto bactericida total, siendo el comportamiento cuantitativo de la viabilidad muy similar al presentado por los *Pediococcus spp*.

*Saccharomyces uvarum* no presentó alteración en ninguno de los parámetros cinéticos evaluados a los diferentes valores de pH y tiempos de exposición, las cuentas viables obtenidas se mantuvieron constantes en su número ( $16.0 \times 10^6$ ).

La evaluación cuantitativa de los diferentes valores de pH a la concentración de  $16.0 \times 10^6$  microorganismos por mililitro, nos muestra que al incrementar de nuevo la biomasa, el poder desinfectante del pH ácido disminuye según se puede ver en el siguiente análisis:

Para que los valores de pH de 2.00 y 2.25 logran el 100 por ciento de efectividad biocida, el tiempo de exposición se tuvo que alargar hasta 90 min. para *Pediococcus spp* y 30 min. para los *Lactobacillus spp*.

Para los otros valores de pH (2.50, 2.75 y 3.00), la evaluación es la siguiente; los *Pediococcus spp* presentan más resistencia que los *Lactobacillus spp* a los efectos desinfectantes del pH ácido, ésto se pudo evaluar de manera cuantitativa en el experimento. Mientras que a pH de 2.50 el porcentaje de efectividad a los 30 min. de exposición fué de 90 % para los *Pediococcus spp*, para los *Lactobacillus spp* fué de un 99.3 %, conforme se aumentó el tiempo de exposición el porcentaje se incrementó para cada microorganismo en estudio sin llegar al 100 % de efectividad.

La evaluación cuantitativa de los otros valores de pH (2.75 y 3.00) presenta una marcada diferencia en los efectos bactericidas del pH ácido. Mientras que para los *Pediococcus spp* el valor promedio de destrucción es de 63 %, para los *Lactobacillus spp* es de 78 % a los 30 min. de exposición.

Se presentó una relación de 0.8 veces mayor en efecto desinfectante del pH ácido sobre *Lactobacillus spp* que en los *Pediococcus spp*. Esta relación se mantiene más o menos constante en los demás tiempos de exposición.

### 8.3.5 Concentración de $28.0 \times 10^6$ microorganismos por mililitro

La hipótesis planteada al diseñar el experimento, al parecer aquí tiene más fuerza, ya que los *Pediococcus spp* a ningún valor de pH y tiempo de exposición son eliminados totalmente, aún a la exposición de 150 minutos a valor de pH de 2.00 y con una cuenta viable de 200 bacterias/ml, se pudo obtener una cinética de crecimiento de estos microorganismos, pese a las condiciones de estrés a las que fueron expuestas.

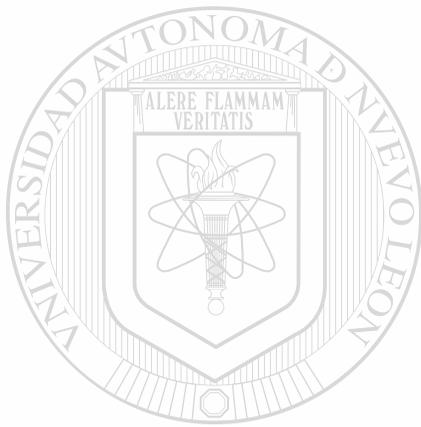
Los *Lactobacillus spp*, a diferencia de *Pediococcus spp*, a los valores de pH de 2.00 y 2.25 son destruidos totalmente según se reporta en las figuras 44 a la 48.

De donde se puede notar el efecto selectivo del pH sobre los microorganismos, ya que además las levaduras no se ven afectadas por la acción del agente ácido desinfectante, en ningún valor de pH y a ningún tiempo de exposición.

La evaluación cuantitativa del efecto biocida del pH ácido a la concentración de  $28.0 \times 10^6$  microorganismos por mililitro, muestra un comportamiento muy semejante a la concentración anterior, con la única diferencia de que a esta cantidad de microorganismos ( $28.0 \times 10^6$ ), la actividad desinfectante del pH se hace más selectivo, ya que a los primeros 30 min. de exposición a valores de pH de 2.00 y 2.25, los *Lactobacillus*

*spp* son destruídos totalmente y los *Pediococcus spp* no, inclusive después de 180 min. de ser expuestos a esos valores de pH no son eliminados por completo.

Los otros valores de pH (2.50, 2.75 y 3.00), presentan un comportamiento muy similar, en cada tiempo de exposición evaluado ya que los *Pediococcus spp*, son más resistentes a los efectos biocidas del pH ácido que los *Lactobacillus spp* en proporción de aproximadamente 0.45 veces para valores de pH 2.50 y de 0.8 para 2.75 y 3.00, en cada tiempo de exposición evaluados en las pruebas. Las levaduras no tuvieron ningún cambio cuantitativo ni cualitativo durante la realización de la experimentación.

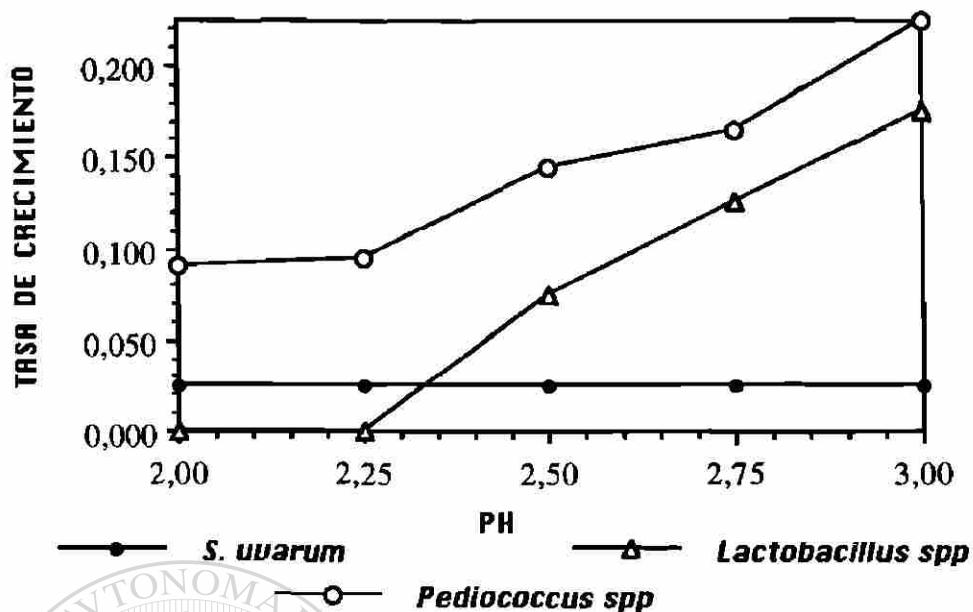


# UANL

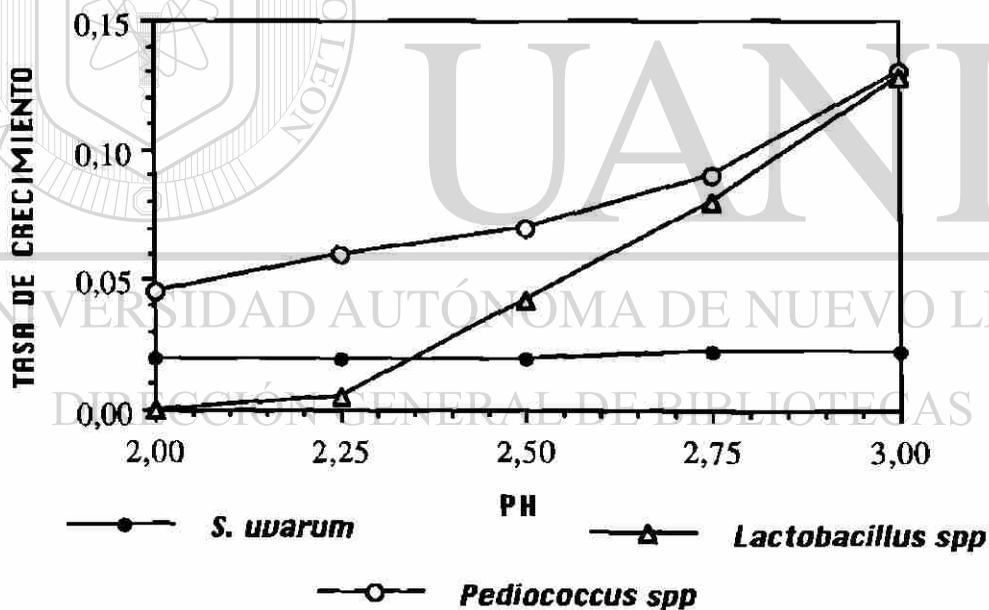
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura No 5** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^5$  cel. / ml ), a 30 min. de exposición.



**Figura No 6** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 30 min. de exposición.

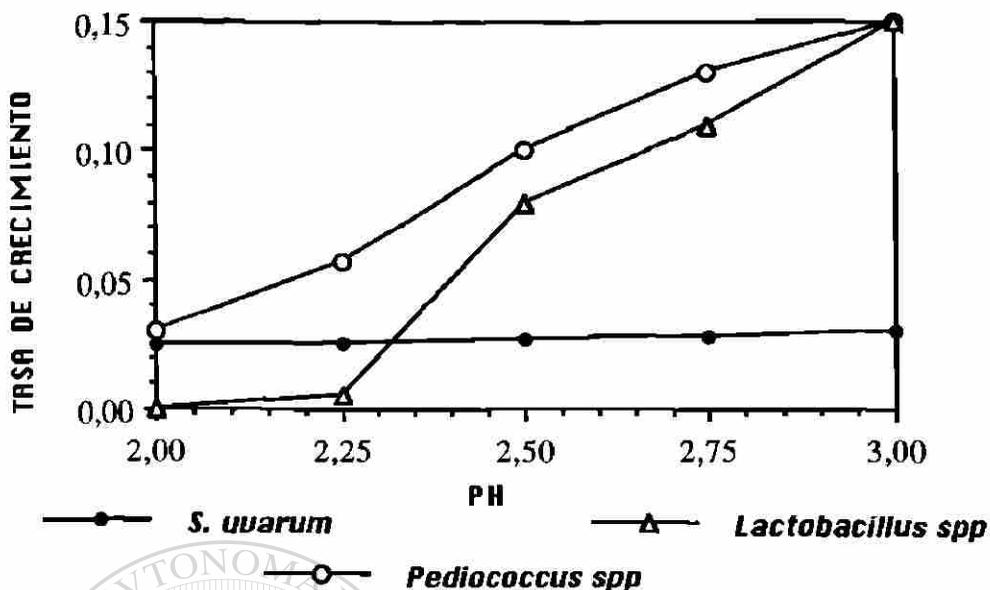


Figura No 7 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $16.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 30 min. de exposición.

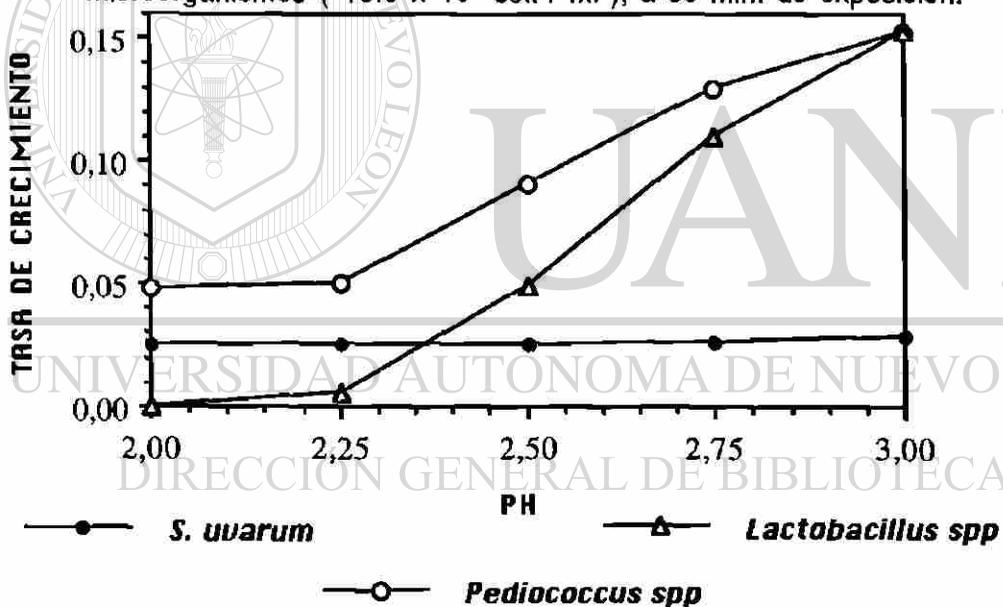
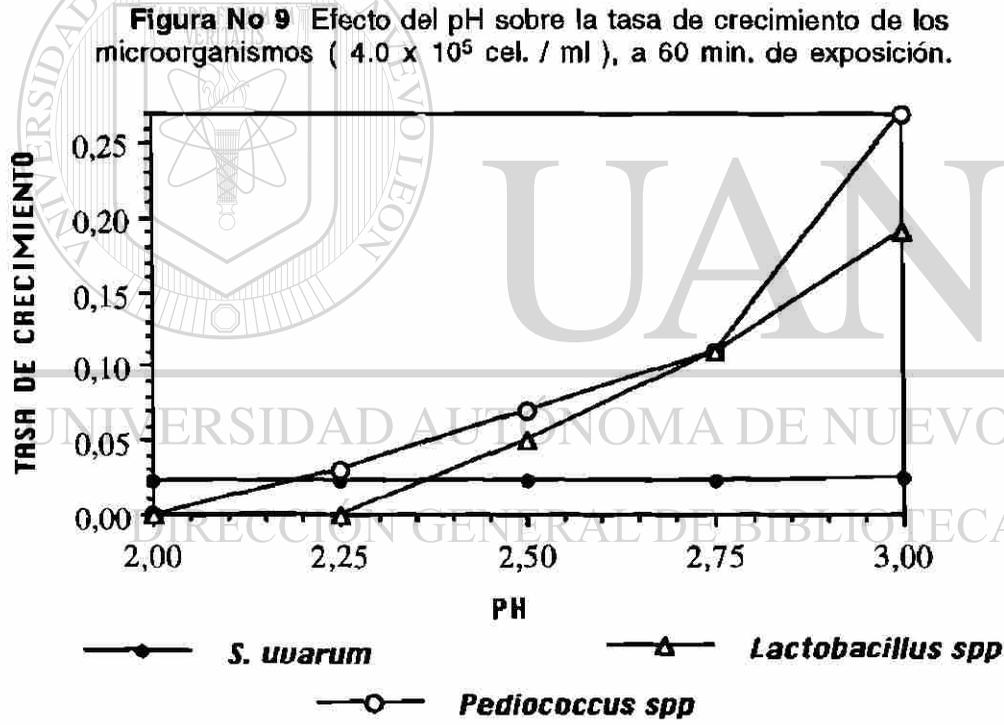
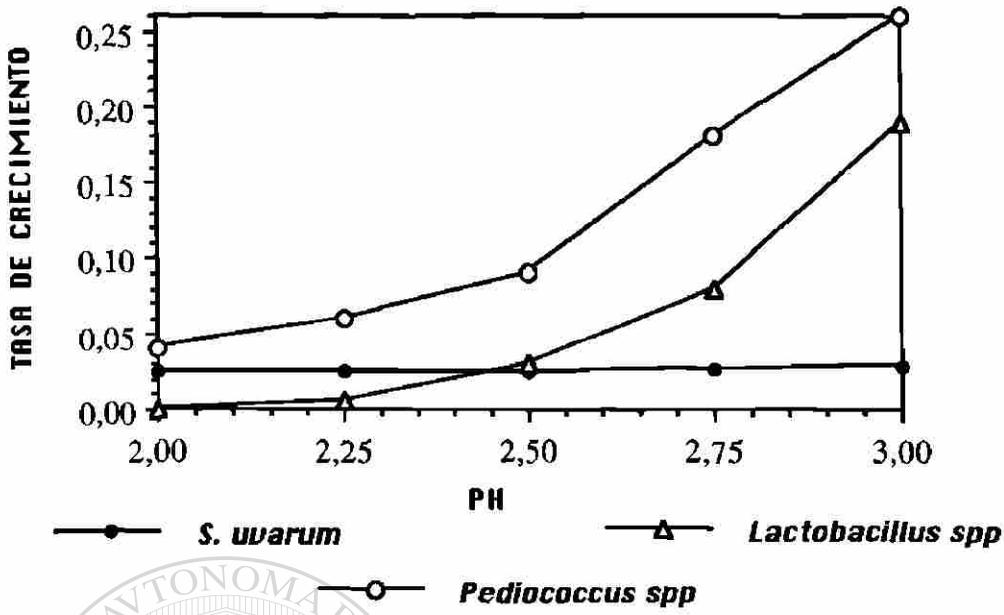
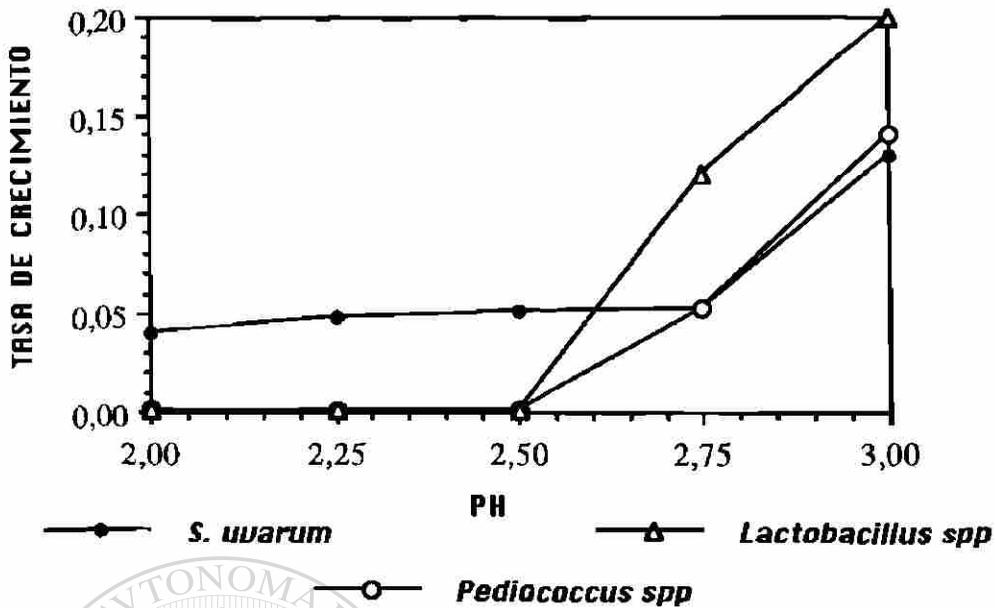
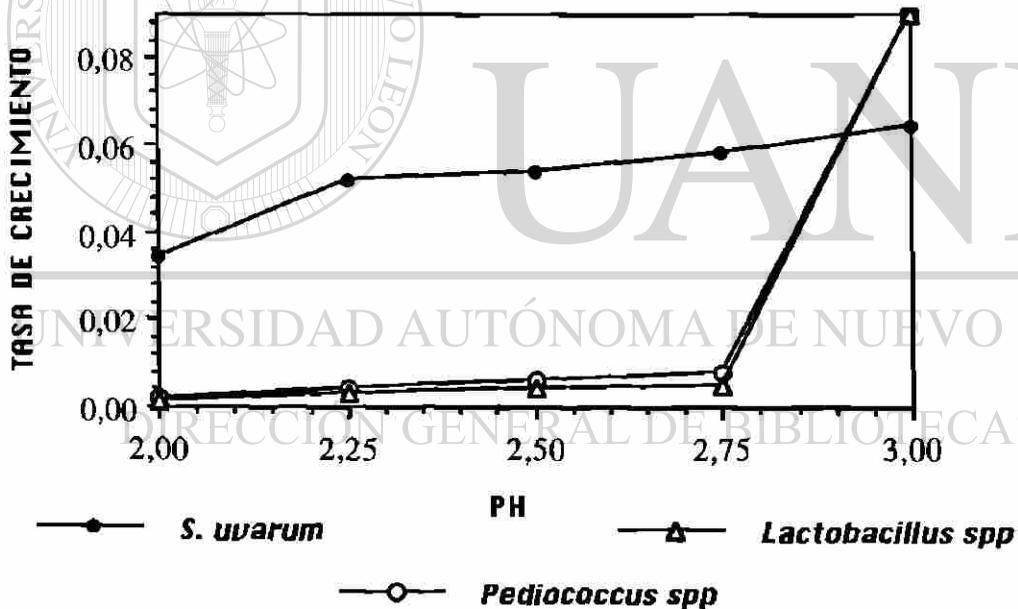


Figura No 8 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $28.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 30 min. de exposición.





**Figura No 11** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $16.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 60 min. de exposición.



**Figura No 12** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $28.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 60 min. de exposición.

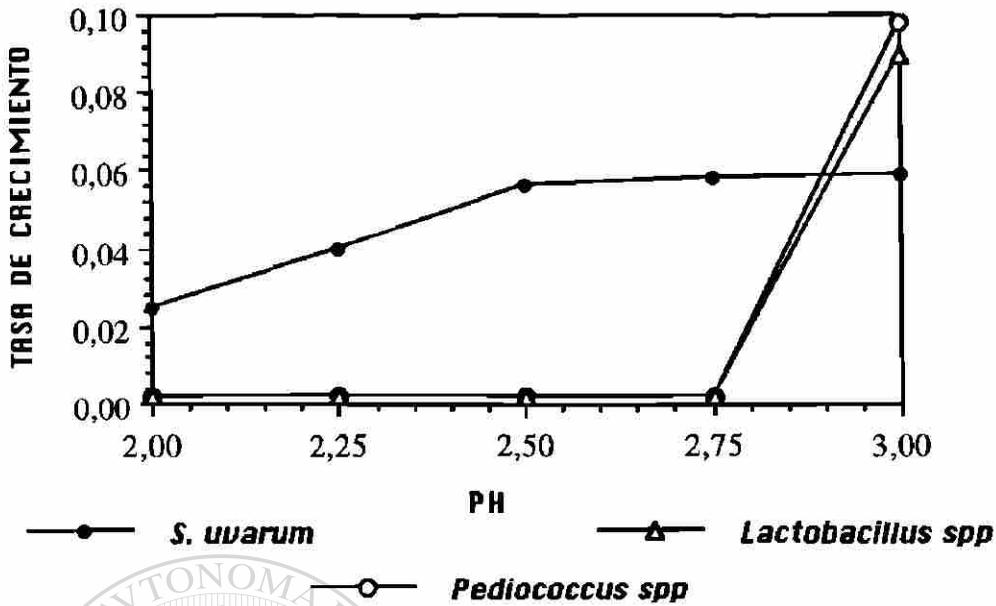


Figura No 13 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^5$  cel. / ml ), a 90 min. de exposición.

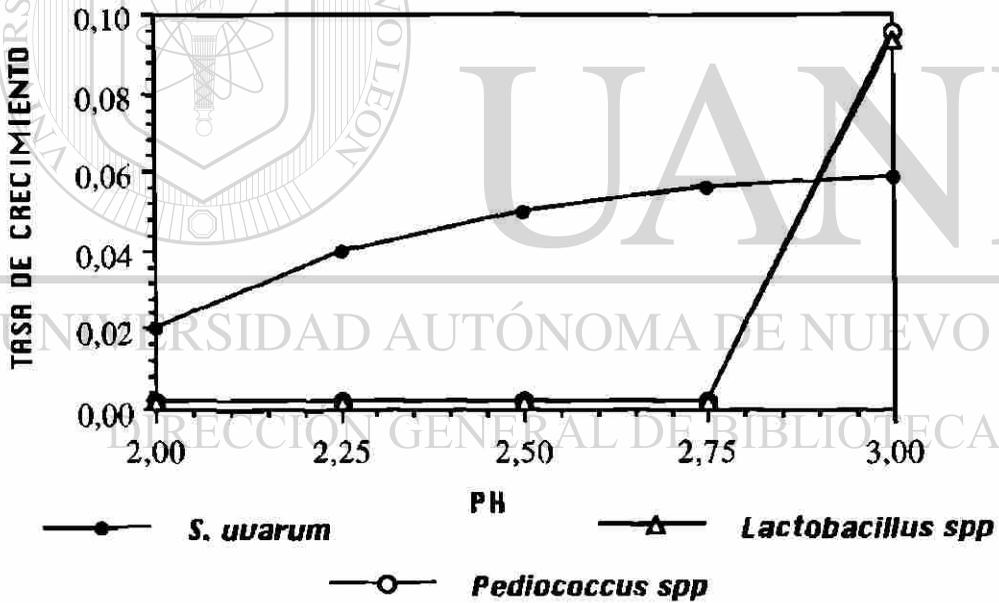


Figura No 14 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 90 min. de exposición.

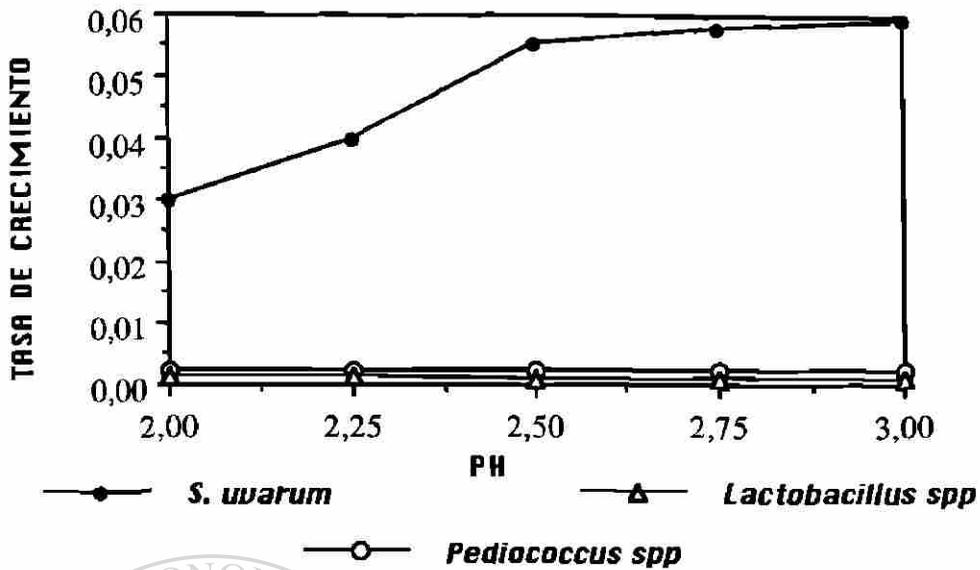


Figura No 15 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $16.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 90 min. de exposición.

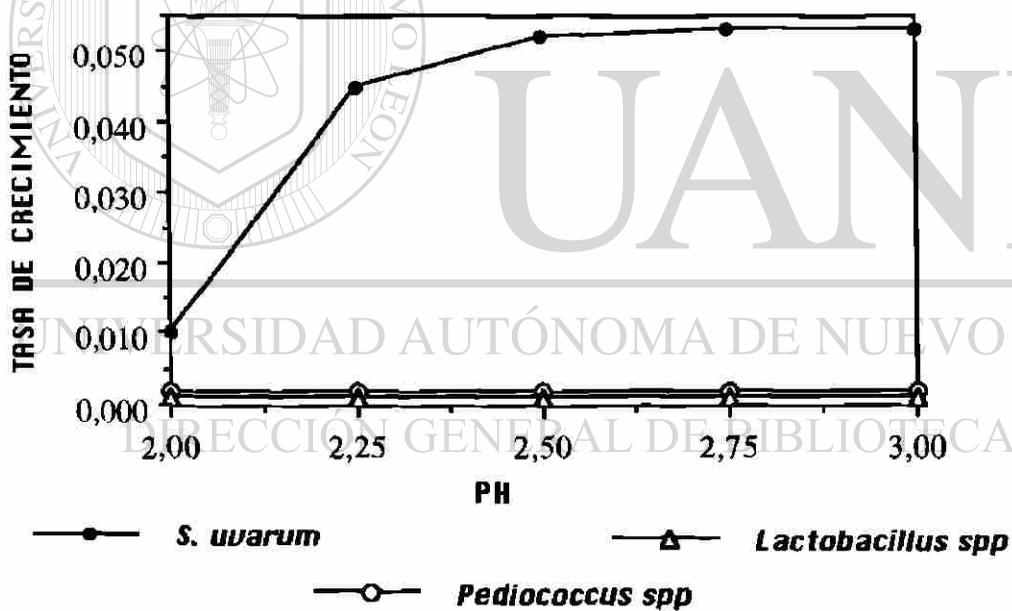
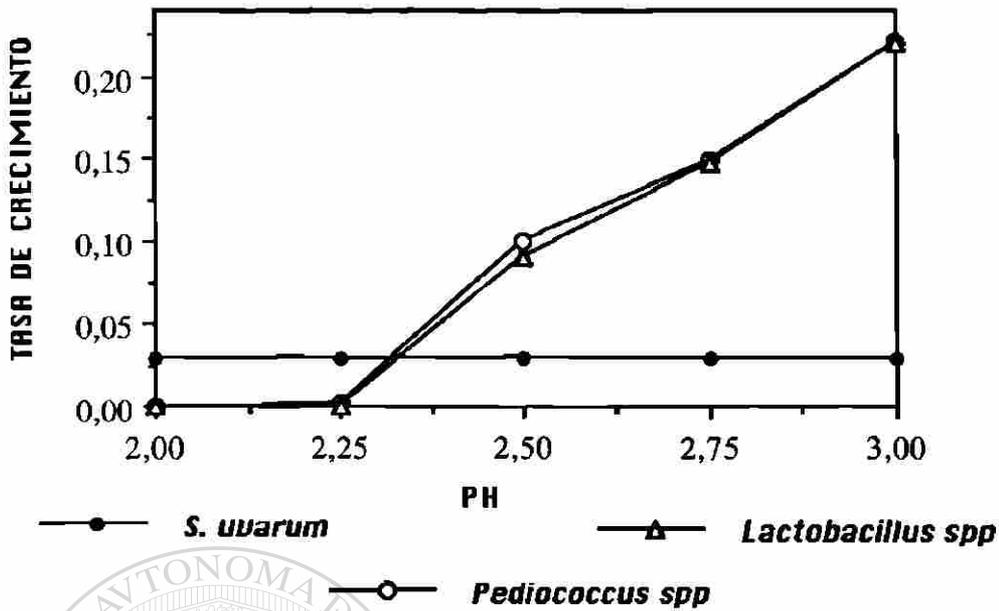
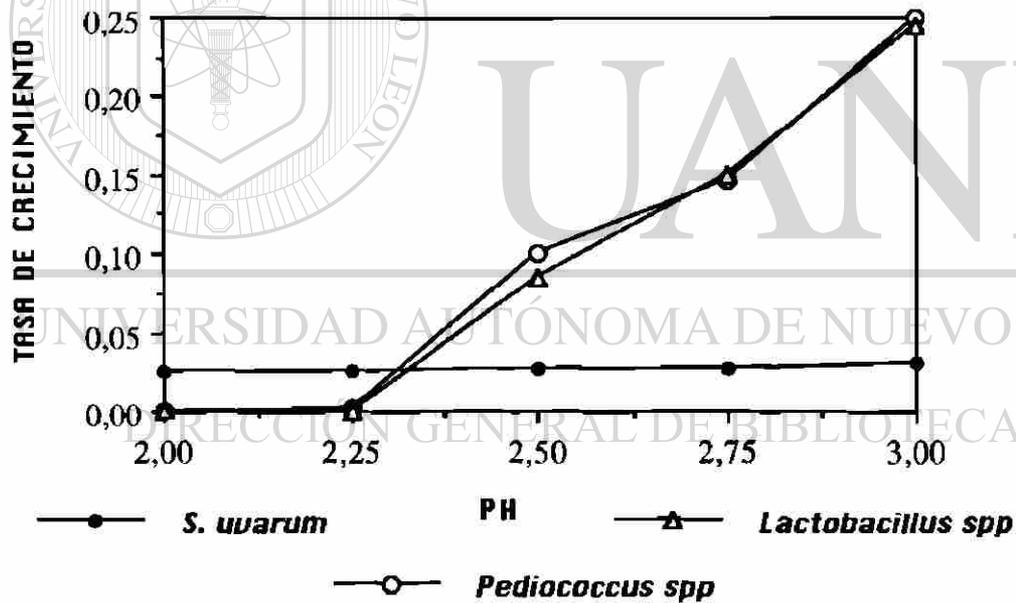


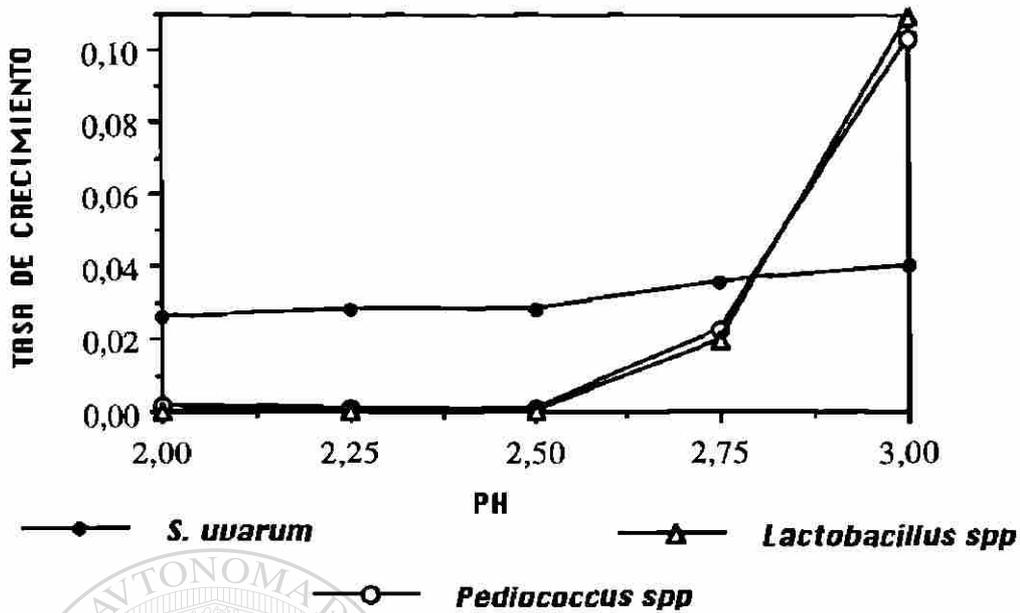
Figura No 16 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $28.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 90 min. de exposición.



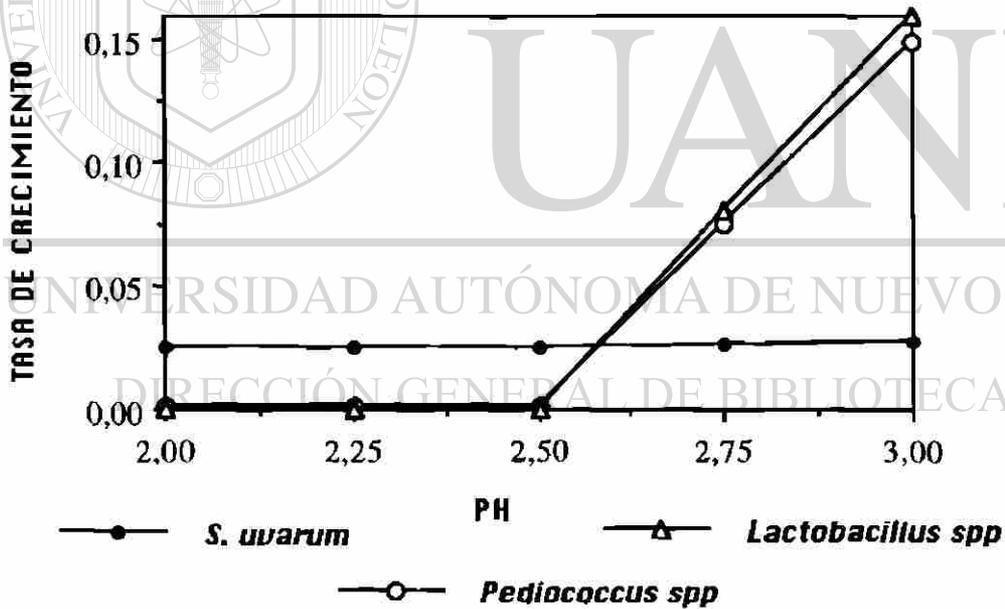
**Figura No 17** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^5$  cel. / ml ), a 120 min. de exposición.



**Figura No 18** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 120 min. de exposición.



**Figura No 19** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $16.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 120 min. de exposición.



**Figura No 20** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $28.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 120 min. de exposición.

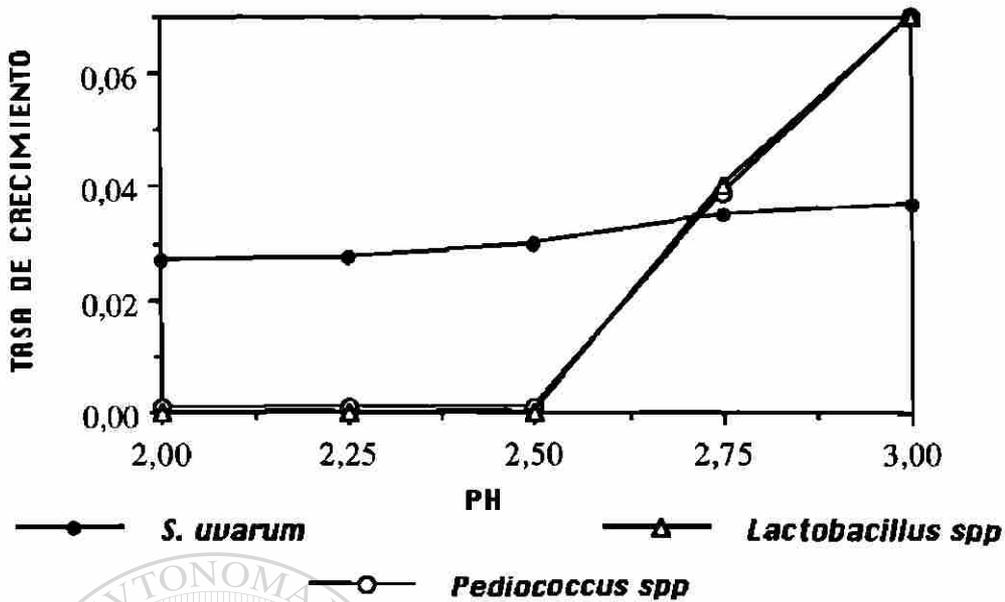


Figura No 21 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^5$  cel. / ml ), a 150 min. de exposición.

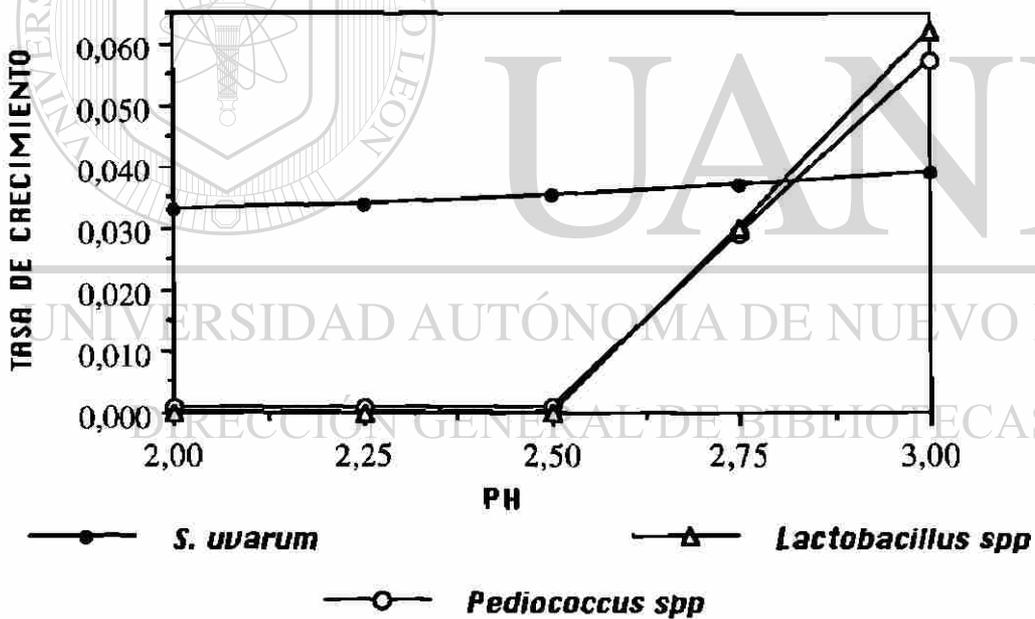
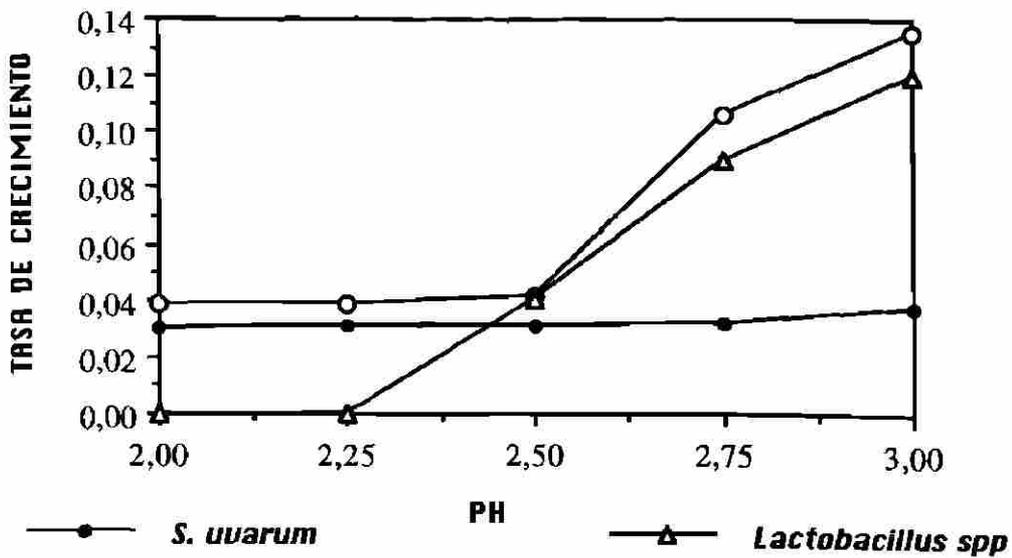
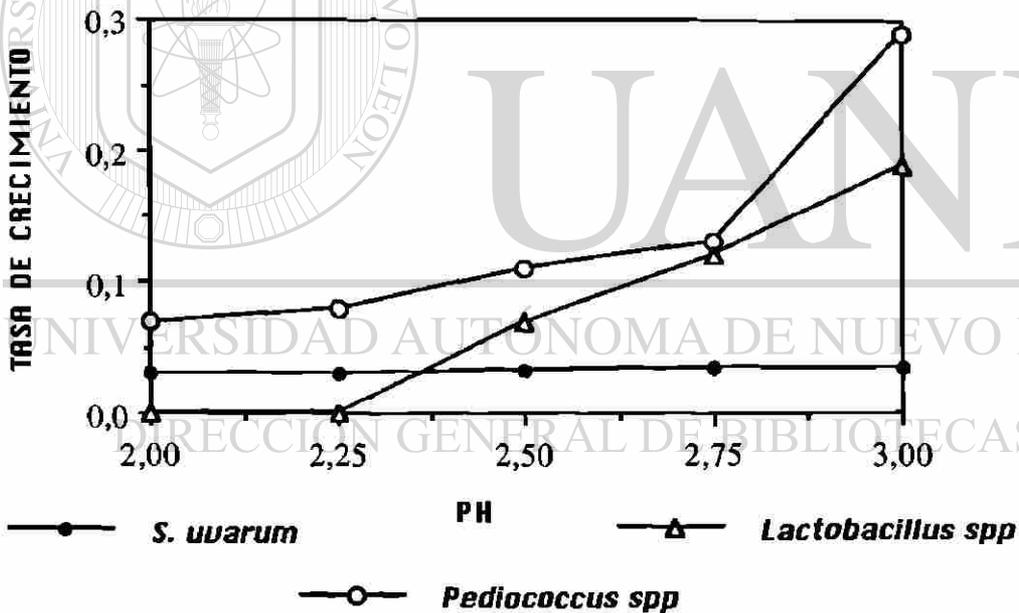


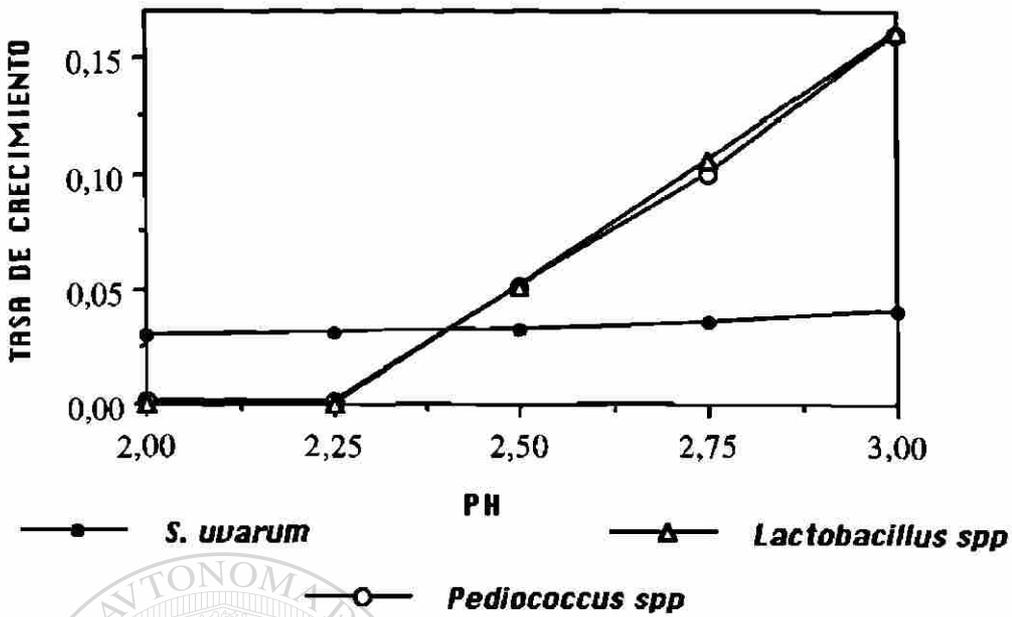
Figura No 22 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 150 min. de exposición.



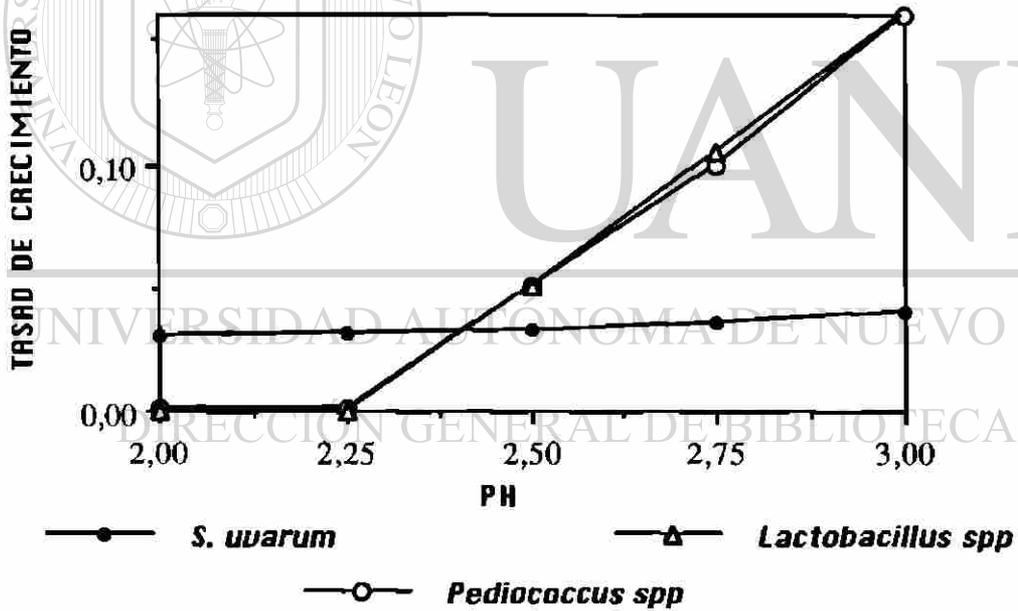
**Figura No 23** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $16.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 150 min. de exposición.



**Figura No 24** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $28.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 150 min. de exposición.



**Figura No 25** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^5$  cel. / ml ), a 180 min. de exposición.



**Figura No 26** Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $4.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 180 min. de exposición.

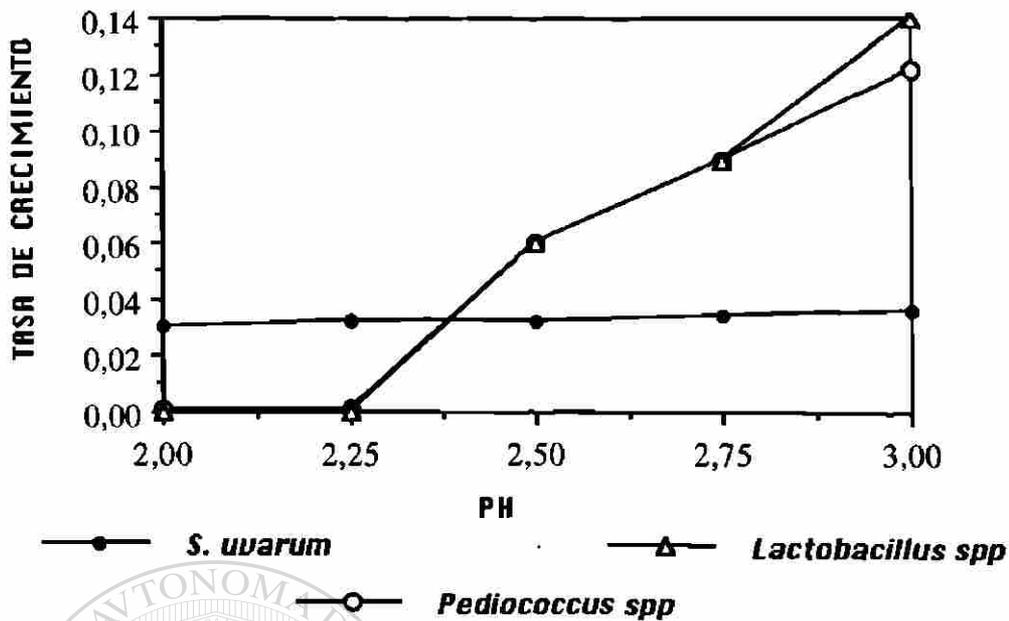


Figura No 27 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $16.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 180 min. de exposición.

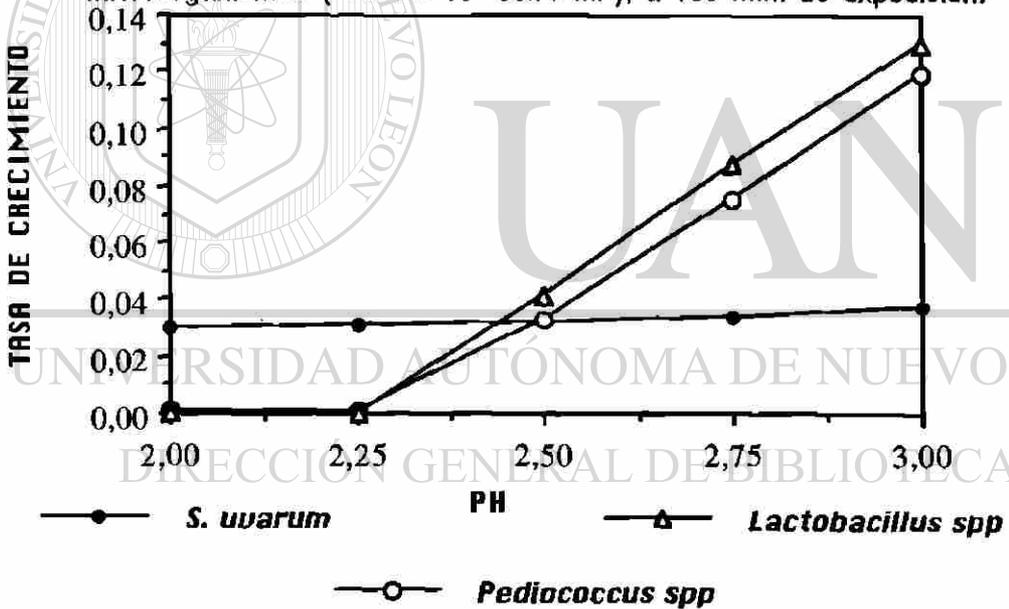
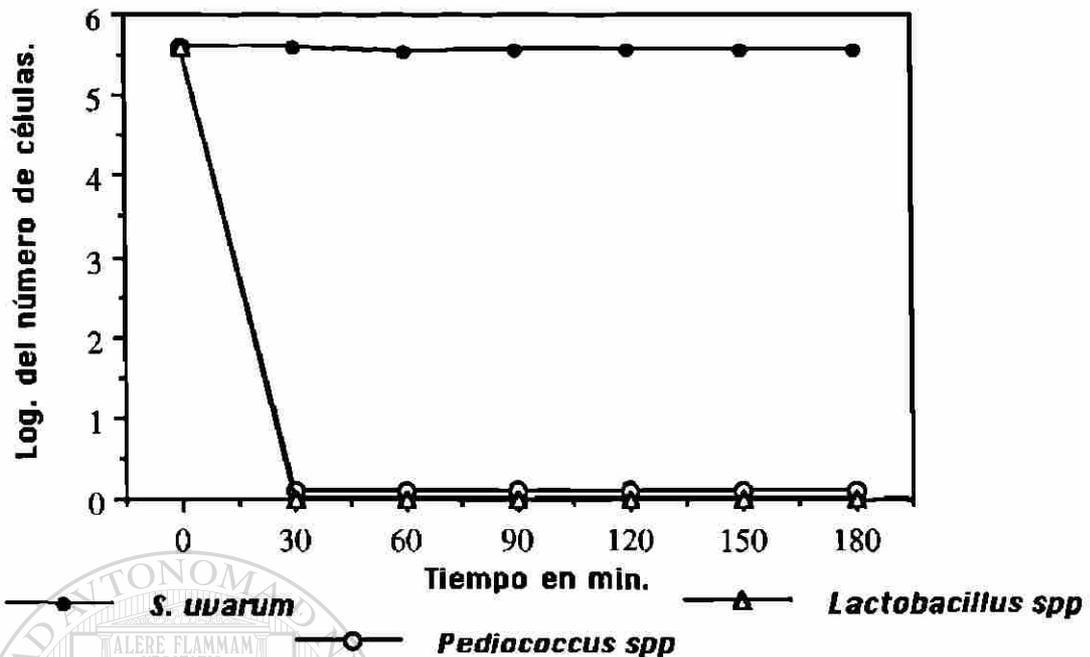
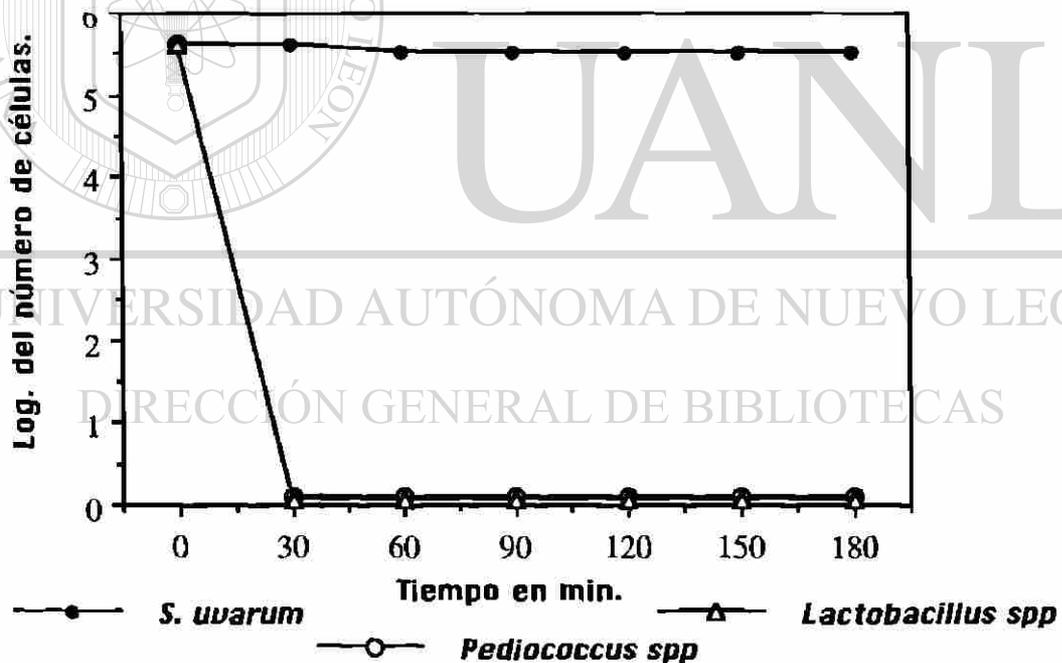


Figura No 28 Efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos (  $28.0 \times 10^6$  cel. / ml ), a 180 min. de exposición.



**Figura No 29** Efecto bactericida del pH de 2.00 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^5$  células por ml.



**Figura No 30** Efecto bactericida del pH de 2.25 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^5$  células por ml.

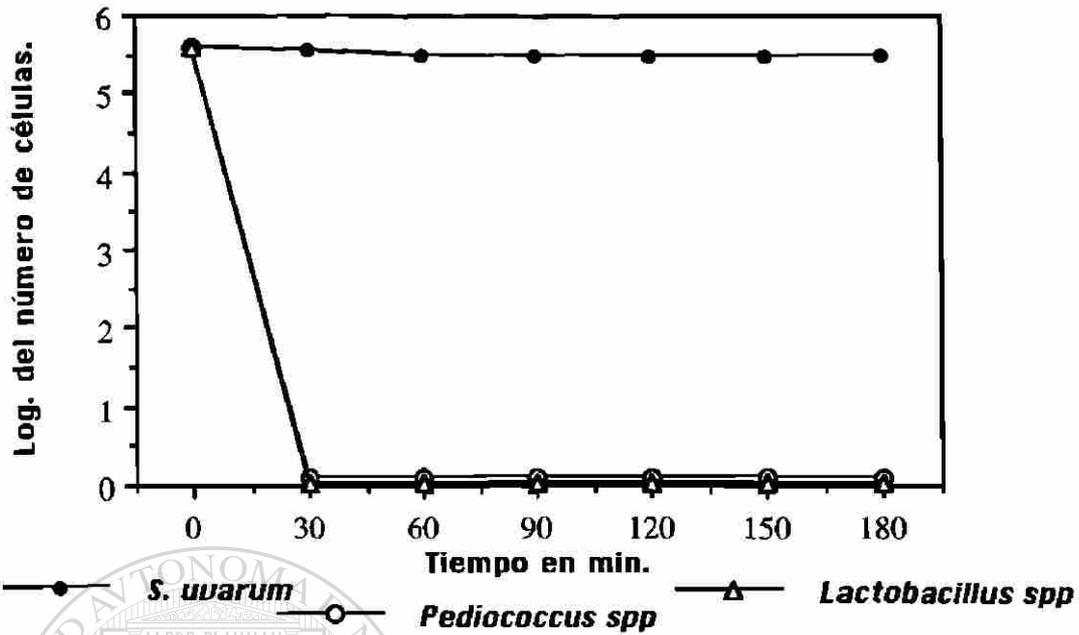


Figura No 31 Efecto bactericida del pH de 2.50 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^5$  células por ml.

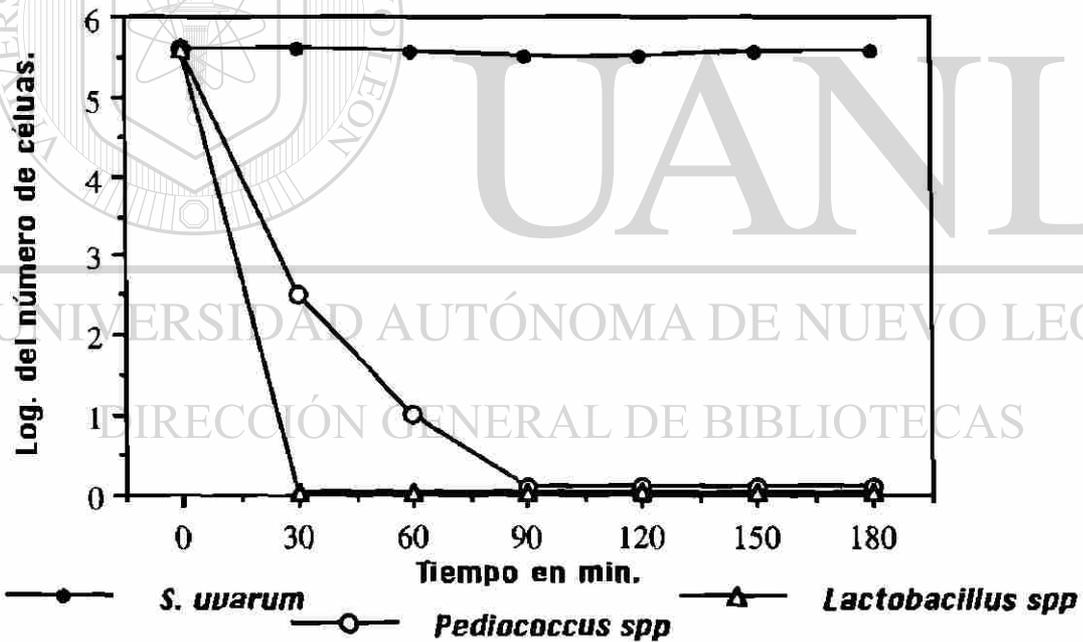
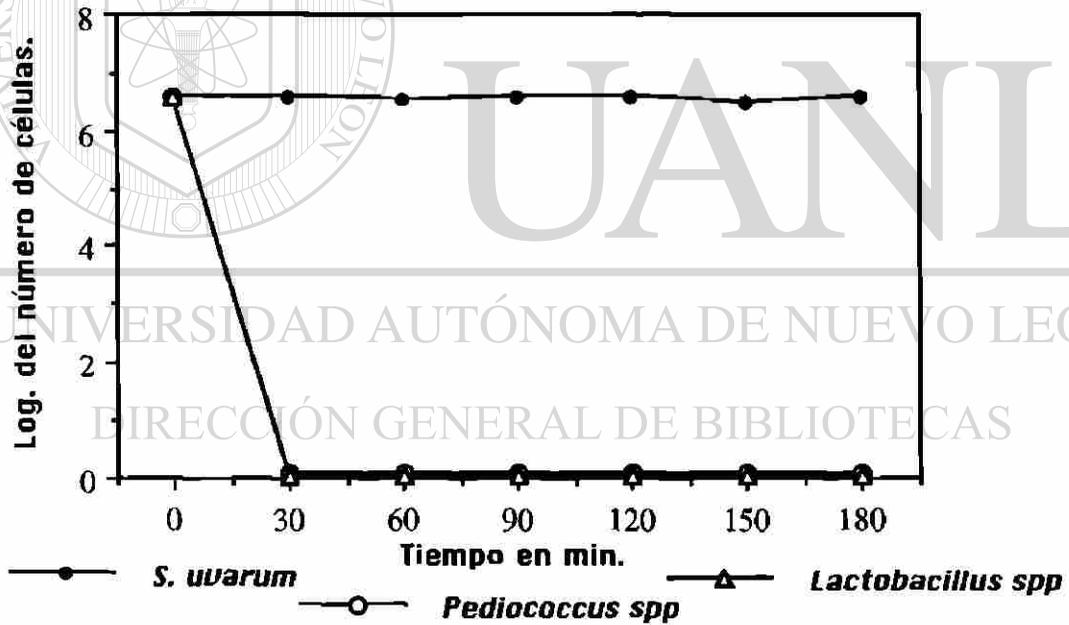
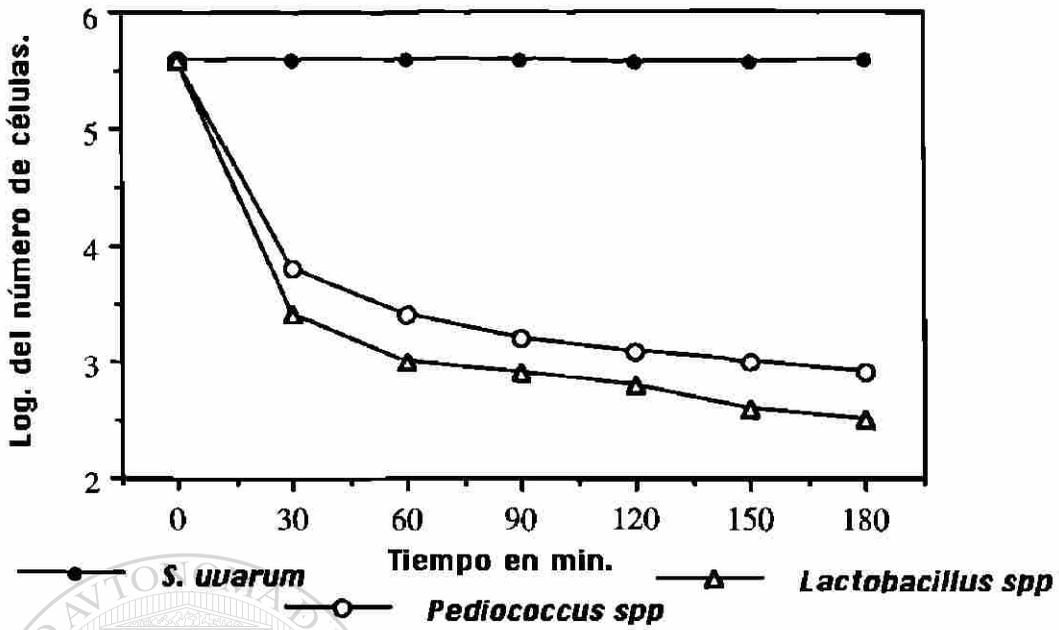
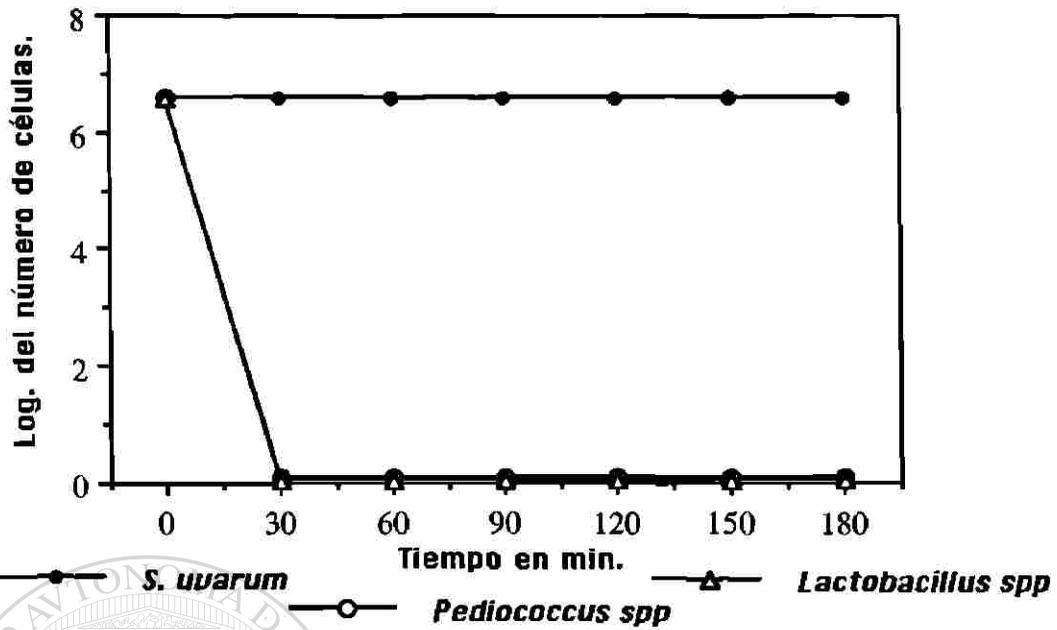
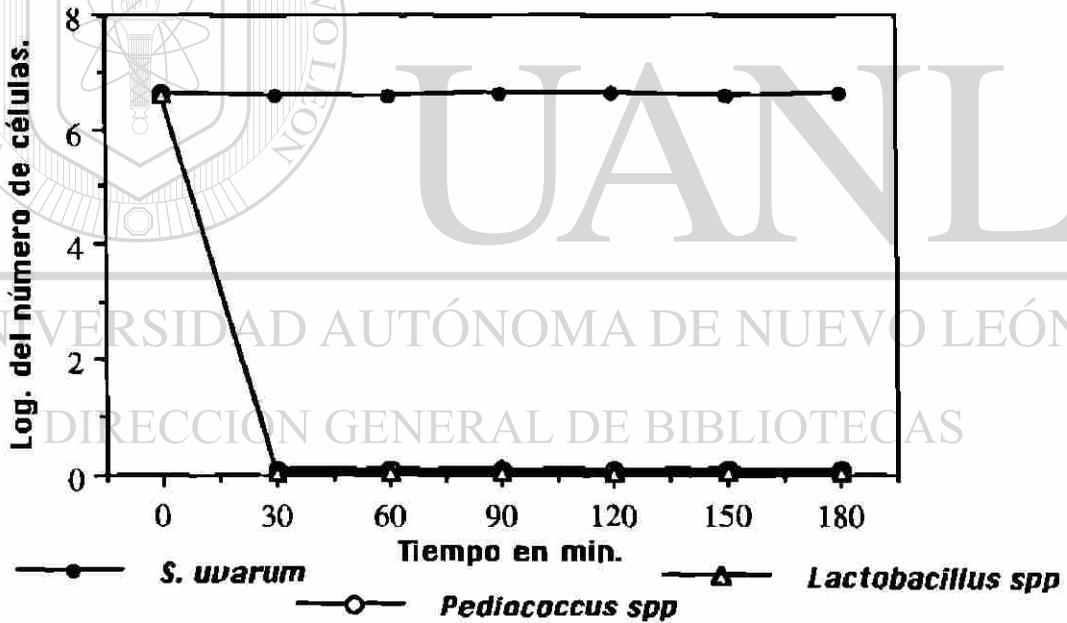


Figura No 32 Efecto bactericida del pH de 2.75 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^5$  células por ml.





**Figura No 35** Efecto bactericida del pH de 2.25 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^6$  células por ml.



**Figura No 36** Efecto bactericida del pH de 2.50 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^6$  células por ml.

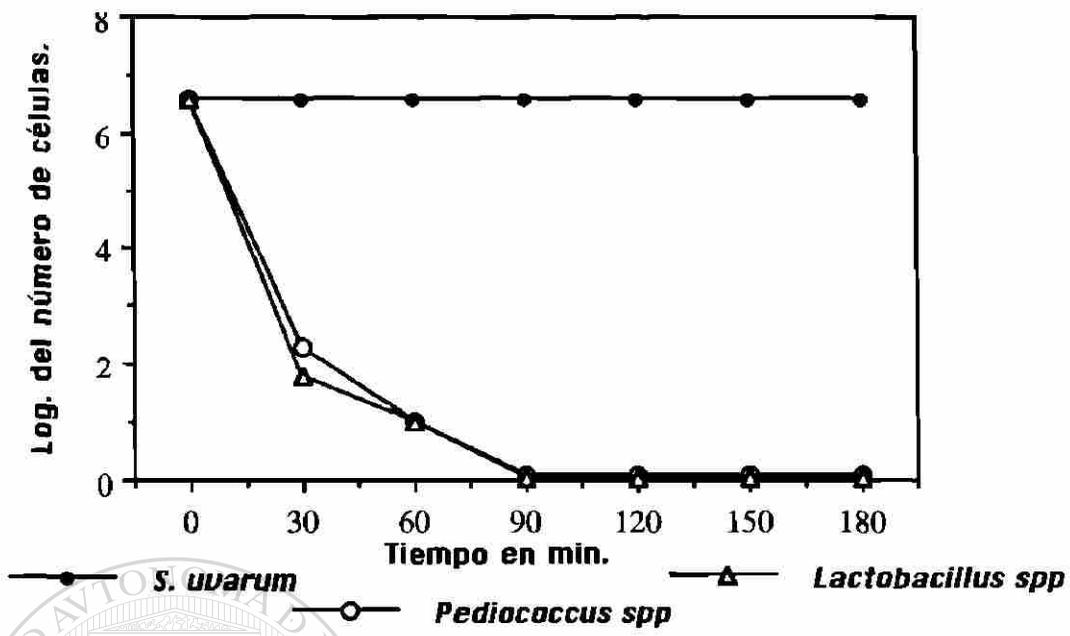


Figura No 37 Efecto bactericida del pH de 2.75 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^6$  células por ml.

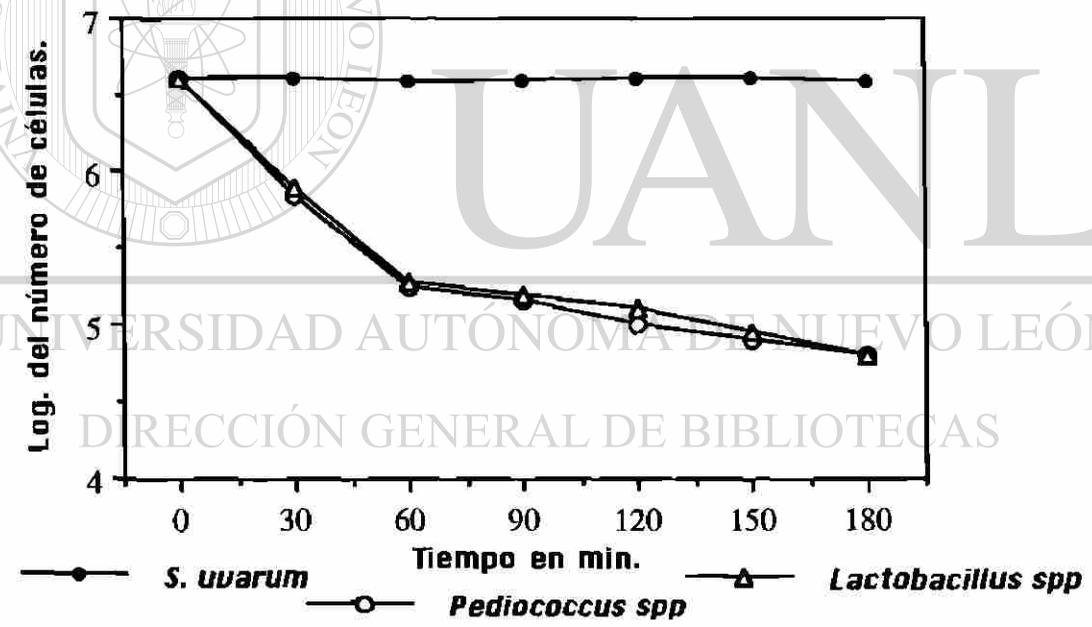


Figura No 38 Efecto bactericida del pH 3.00 sobre los microorganismos a una concentración de  $4.0 \times 10^6$  células por ml.

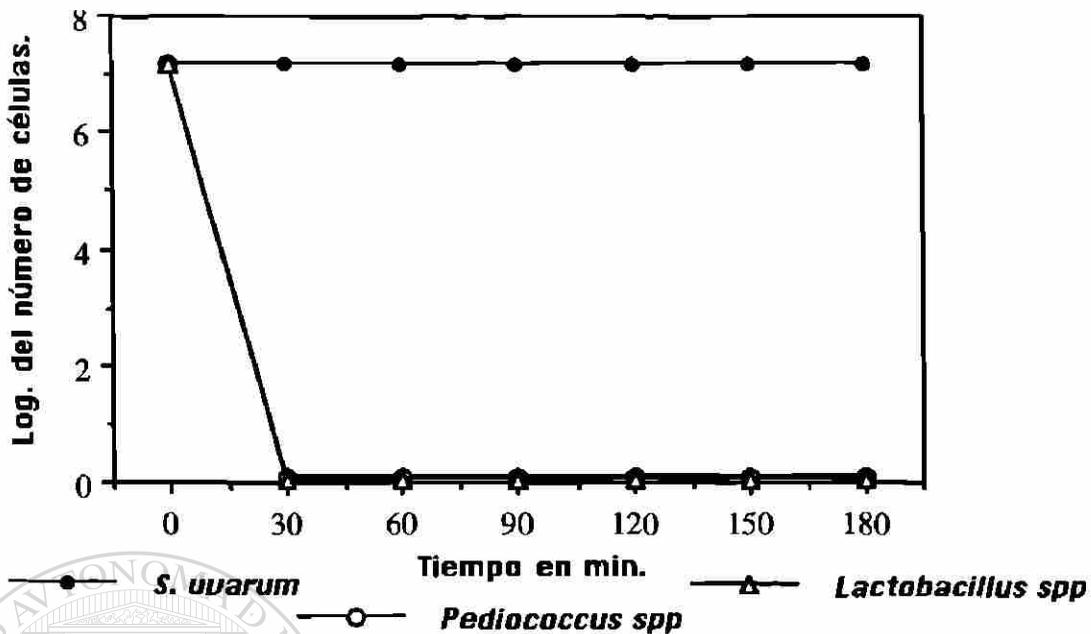


Figura No 39 Efecto bactericida del pH 2.00 sobre los microorganismos a una concentración de  $16.0 \times 10^6$  células por ml.

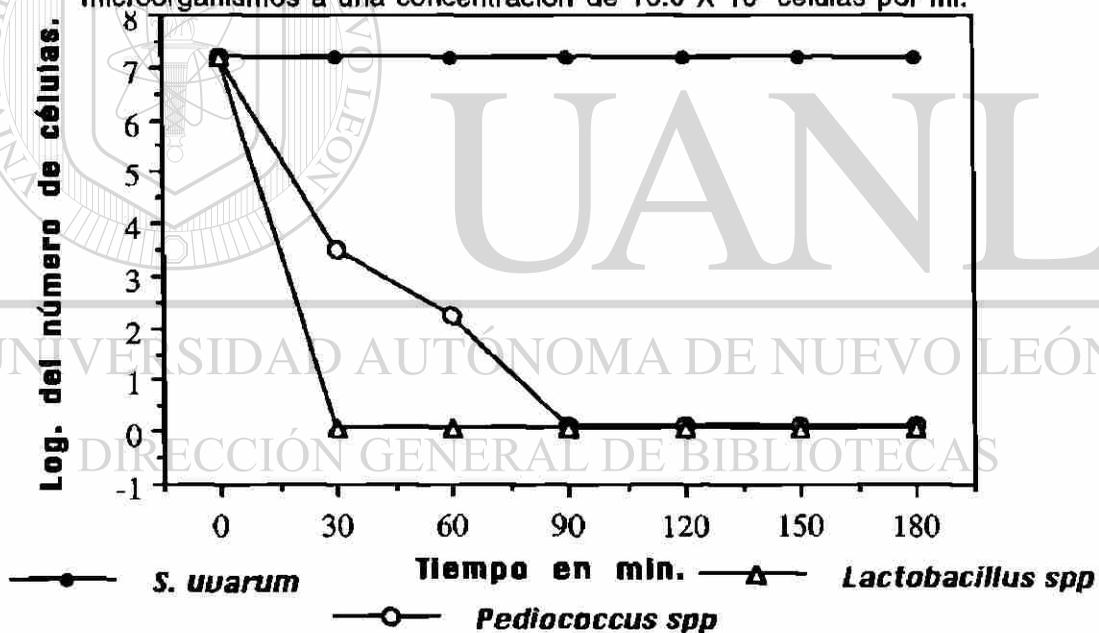


Figura No 40 Efecto bactericida del pH 2.25 sobre los microorganismos a una concentración de  $16.0 \times 10^6$  células por ml.

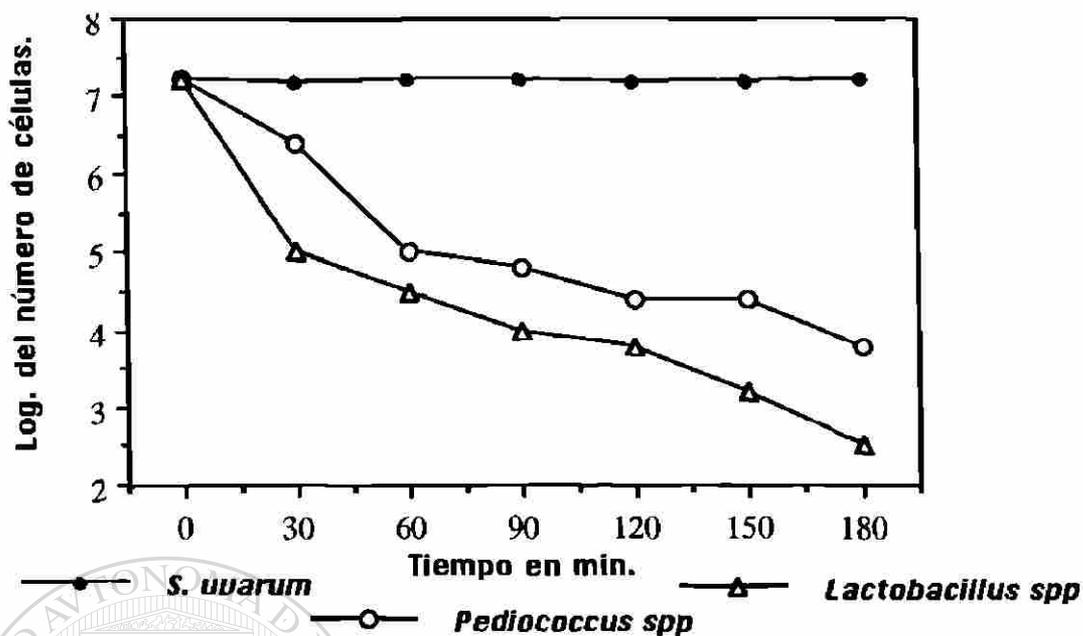


Figura No 41 Efecto bactericida del pH 2.50 sobre los microorganismos a una concentración de  $16.0 \times 10^6$  células por ml.

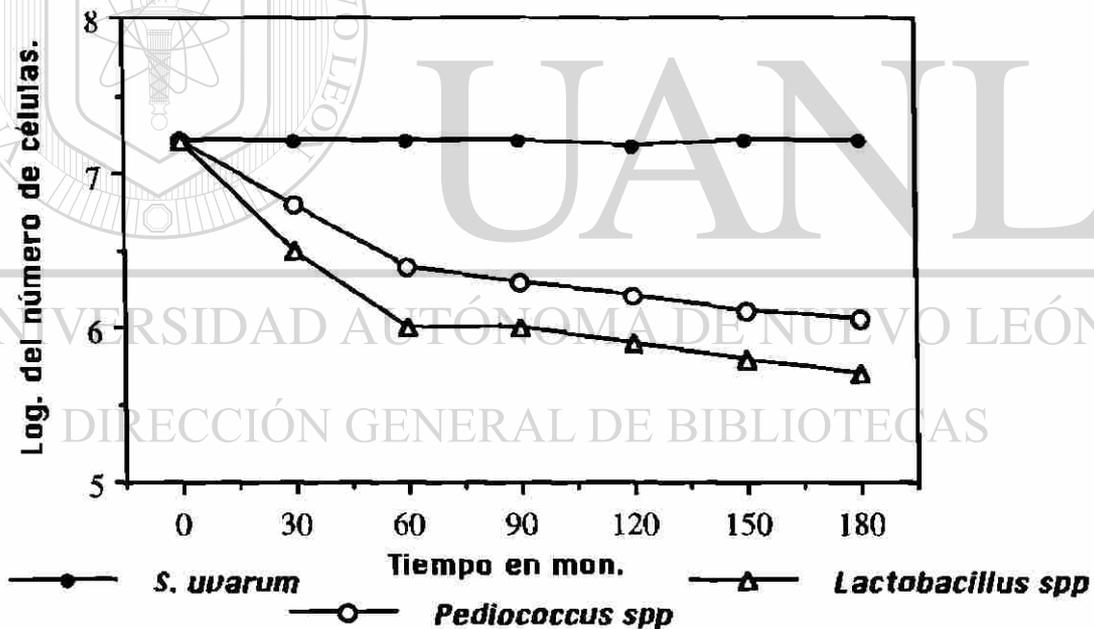


Figura No 42 Efecto bactericida del pH 2.75 sobre los microorganismos a una concentración de  $16.0 \times 10^6$  células por ml

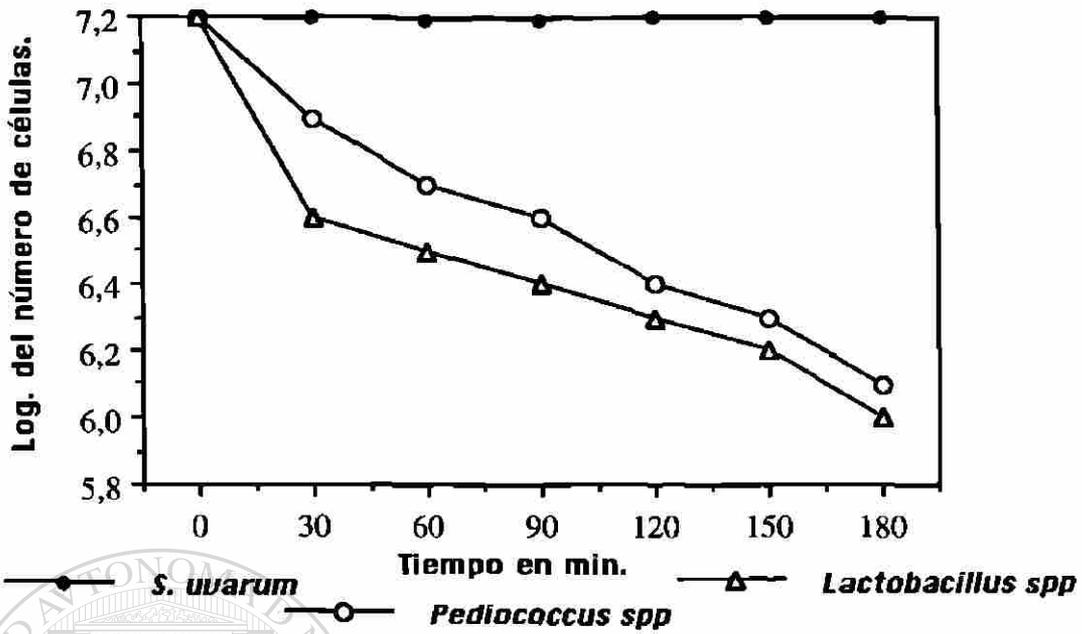


Figura No 43 Efecto bactericida del pH 3.00 sobre los microorganismos a una concentración de  $16.0 \times 10^6$  células por ml.

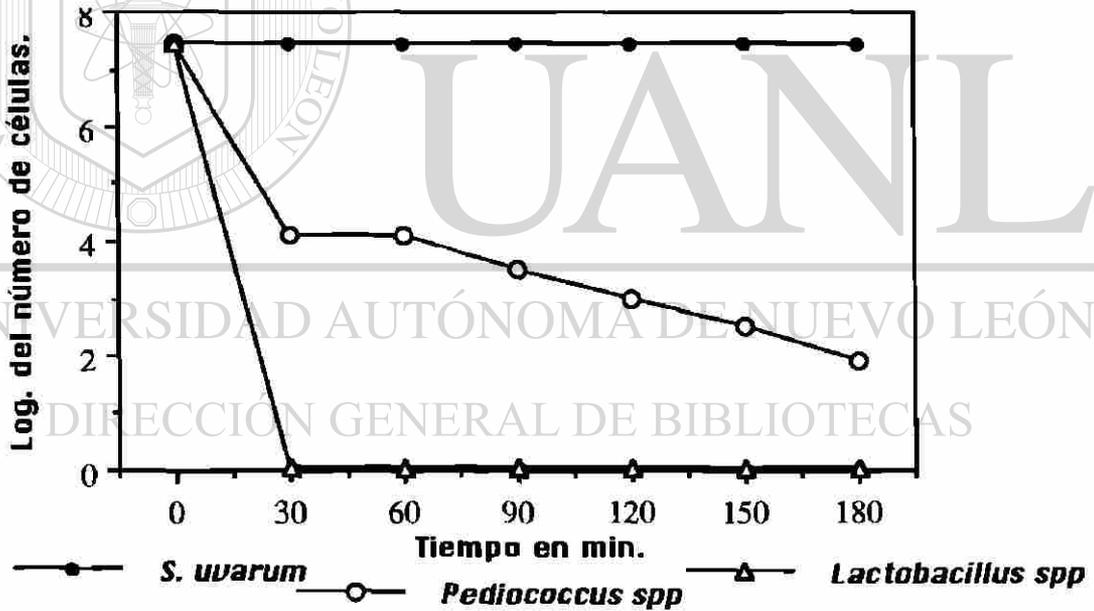


Figura No 44 Efecto bactericida del pH 2.00 sobre los microorganismos a una concentración de  $28.0 \times 10^6$  células por ml.

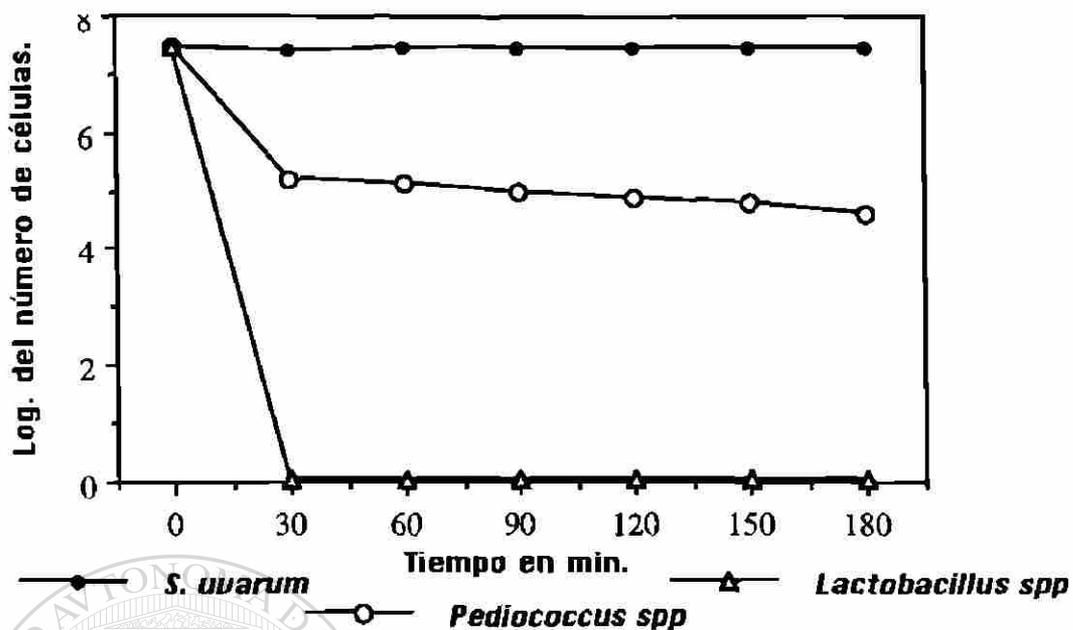


Figura No 45 Efecto bactericida del pH 2.25 sobre los microorganismos a una concentración de  $28.0 \times 10^6$  células por ml.

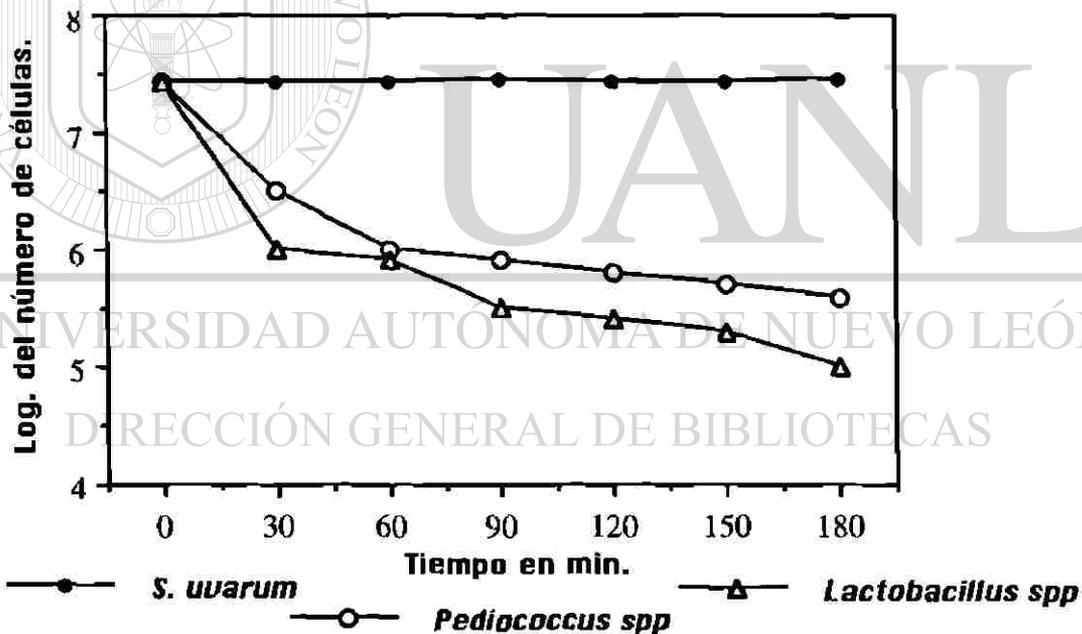


Figura No 46 Efecto bactericida del pH 2.50 sobre los microorganismos a una concentración de  $28.0 \times 10^6$  células por ml.

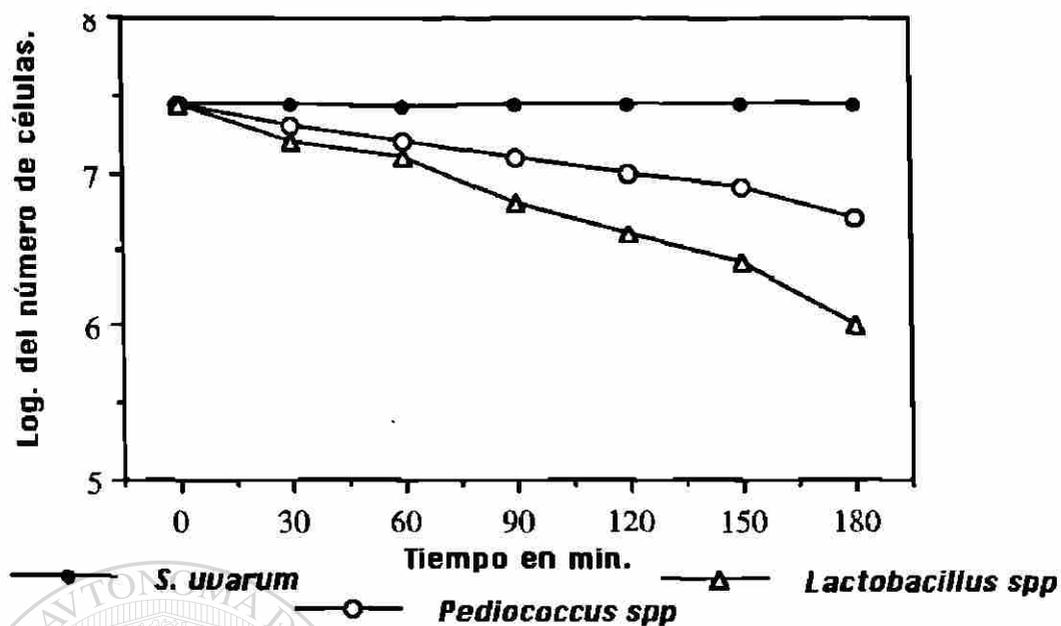


Figura No 47 Efecto bactericida del pH 2.75 sobre los microorganismos a una concentración de  $28.0 \times 10^6$  células por ml.

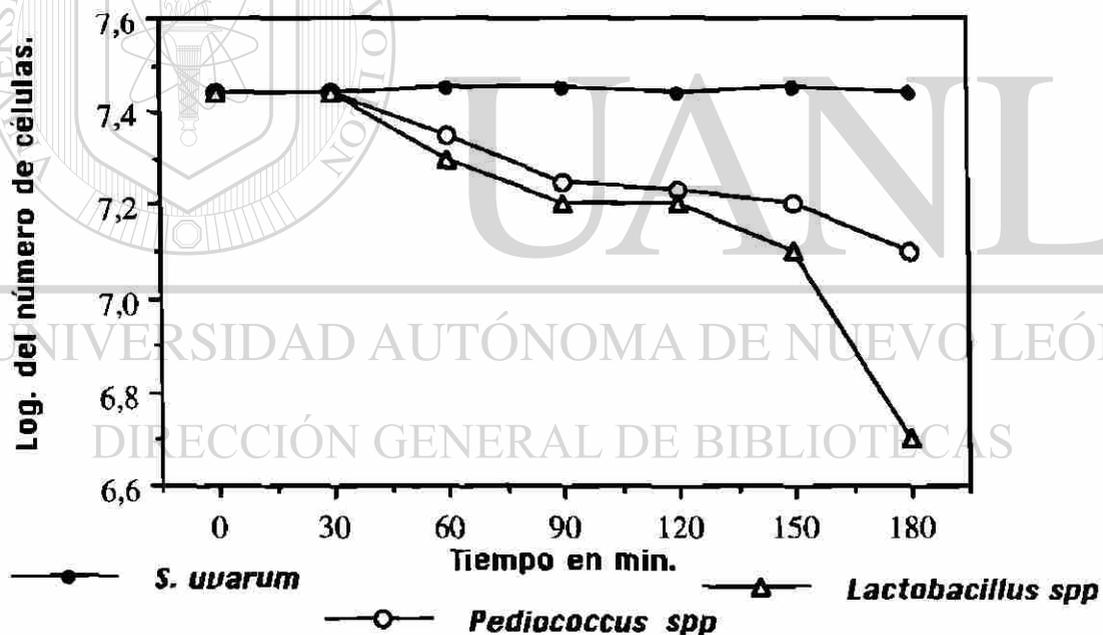


Figura No 48 Efecto bactericida del pH 3.00 sobre los microorganismos a una concentración de  $28.0 \times 10^6$  células por ml.

## 9. CONCLUSIONES

### 9.1 Conclusiones

\*El efecto del pH sobre la tasa de crecimiento de los microorganismos está relacionado directamente con la concentración de biomasa.

\*Los microorganismos involucrados en la investigación, tuvieron diferente comportamiento a los efectos del pH, pero se puede decir, que el pH con valor de 3.00, a los tiempos de exposición establecidos, es el que menos efecto presenta sobre los microorganismos. En orden de resistencia a los cambios de pH se puede sugerir que la levadura *Saccharomyces uvarum* fué la más resistente a los cambios, seguida después de *Pediococcus spp*, y finalmente, los *Lactobacillus spp*.

\*La respuesta que se tuvo de los diferentes valores de pH sobre los microorganismos en este caso se puede decir que fué selectiva, ya que por los datos obtenidos, nos podemos dar cuenta que los primeros microorganismos que fueron eliminados por la acción del pH son los *Lactobacillus*, seguidos después por los *Pediococcus*, dejando activa a la levadura a los tiempos de exposición estudiados. Cabe aclarar que si se incrementa el tiempo de exposición, posiblemente se hubiera afectado a la levadura pero en este estudio no sucedió así.

\*Los valores bajos de pH (2.00 y 2.25) , son los que presentan mayor efecto bactericida, según los datos reportados, como consecuencia de ésto, estos valores se pueden tomar en cuenta para ser aplicados como sistemas de desinfección, en caso de que se presenten problemas sanitarios en los cuales se relacionen con los microorganismos en cuestión.

\*Se debe de tomar en consideración que a bajas concentraciones de biomasa, no se requieren períodos largos de exposición; y también, se podría modificar el valor del pH.

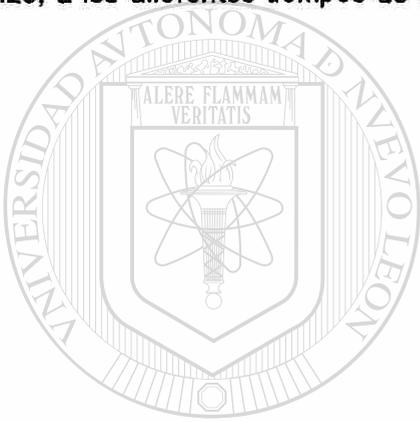
\*Uno de los datos que tienen prioridad en el estudio, es la reactivación: Debido a la importancia que tiene en la industria de alimentos y de fermentaciones la calidad sanitaria de todo el proceso, los métodos que se apliquen para lograr condiciones de sanidad dentro de una planta, deben de asegurar que los microorganismos que son causantes de problemas de contaminación sean eliminados totalmente, y asegurarse de que no se presentará un proceso de reactivación de los gérmenes ya que el problema de contaminación se volvería a repetir.

\*Para el diseño de futuros experimentos, se debe de tomar en cuenta las principales variables del método como son : tiempo de exposición, concentración de microorganismos ,

y los valores de pH. Esto nos permitiría hacer más óptimo el método y tener el control de la principal variable que es el número de microorganismos a tratar.

\*Una de las ventajas que se le puede ver a esta técnica sobre las ya existentes es que no afectan a los microorganismos de interés, por lo cual el método se hace diferencial, eliminando bacterias contaminantes, y proporcionando ambientes óptimos a los microorganismos que normalmente llevan los procesos fermentativos en las industrias de alimentos.

\*La tasa de crecimiento de los microorganismos que comúnmente se presentan en las industrias cerveceras provocando problemas de contaminación como lo son *Pediococcus* y *Lactobacillus*, se disminuye de una manera considerable y en algunos casos, no hay crecimiento, debido a la destrucción total de los microorganismos por la acción de los diferentes valores de pH utilizados en la prueba. Principalmente los valores de 2.00 y 2.25, a los diferentes tiempos de exposición.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 10. LITERATURA CITADA

- 1.-ADAMS, M.R., O'BRIEN, P.J., TAYLOR, G.T. 1989. Effect of the ethanol content of beer on the heat resistance of a spoilage *Lactobacillus*. J. Appl. Bacteriol. 66: 491 - 493
- 2.-ALAN, D. WATRH. 1989 . Relationships among cell size, membrane permeability, and preservative resistance in yeast species. Appl. Environ. Microbiol. 1: 2995 - 2999
- 3.-AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. 1992. Catalog of Bacteria and Phage, Eighteenth Edition.
- 4.-BAILEY, E. JAMES., OLLIS, F. DAVID. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. Mc GRAW-HILL INTERNATIONAL EDITION. p. 1 - 156.
- 5.-BENJAMIN, C. R., HAYNES, W.C., AND HESSELTINE, C. W. 1964 Microorganisms-What they are, where they grow, what they do. U.S Dept. Agr. ; Agr. Res. Serv. Misc. p. 279 - 298
- 6.-BOBILLO, MERCEDES., MARSHAL, VALERIEM. 1992. Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose limited continuous culture. J. Appl. Bacteriol. 73; 67 - 70
- 7.-BRIAN H-DAVISON AND GREGORY STEPHAROPULOS. 1986. Coexistence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* in chemostat under substrate competition and product inhibition. Biotech. Bioeng. 28: 1217 - 1137.
- 8.-BUCHANAN, R. E. AND GIBBONS, N.E. 1980. Bergeys manual of determinative bacteriology\* The Wilkins and Williams company / Baltimore, eight edition. p. 545 - 598
- 9.-CAMPBELL, I. 1987. Brewing Microbiology, ed., Priest, F. G. and Campbell, I. London. Elsevier Applied Science. p. 541 - 624
- 10.-CHAPMAN, A. G. and ATKINSON, D. E. 1977. Advances in Microbiological Physiology. 15: 253 - 263
- 11-CHAUVET, J., BRECHOT, P.,CROSON, M.,IRRMANN, R. 1966. Anaerobic growth of yeasts during the fermentation of grapes. Ann. Technol. Agr. 15: 99 - 111
- 12.-CHOLELE, H., Mc KELLER, R.C. 1990. Influence of pH on properties of *Lactobacillus helveticus* aminopeptidase. J. Dairy Sci. 73: 2278 - 2282

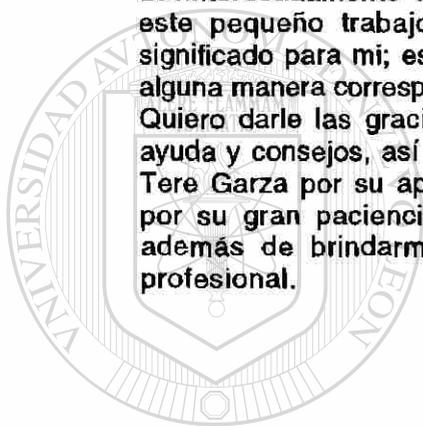
- 13.-DEASCHEL, M.A., FLEMING, H. P., Mc FEETERS, R.F. 1988. Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeast. J. Food Sci. 53: 862 - 865
- 14.-DIFCO MANUAL 1992. Dehydrated culture medium and reagents for microbiology, Ed. DIFCO LABORATORY. Ditroit, Michigan. U.S. tenth edition.
- 15.-DZIEZACK, JUDIE. D. 1987. Yeast and yeast derivatives; Applications . Food Technol. 41: 122 - 125
- 16.-DZIEZACK, JUDIE D. 1987. Yeast and yeast derivatives; Definition, Characteristics and Processing. 41: 104 - 106
- 17.-EL- GENDY, S. M., ABDEL GALIL, H., SHAHINY. 1983. Acetoin and diacetyl production by *Lactobacillus plantarum* to use citrate. J. Food Produc. 46: 503 - 505
- 18.-ESCHENBECHER, R. 1968/1969. Beer spoilage lactobacilli. Brauwissenschaft 21: 424 - 437
- 19.-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION BUREAU OF FOODS. 1978. Bacteriological Analytical Manual (ed. A.O.A.C., Division of Microbiology), Washintong DC., U.S
- 20.-FOWELL, R.R. 1967. Infection control in yeast factories and breweries. Process Biochem. 2: 11 - 15
- 21.-FRAZIER, W. C. 1973. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. segunda edición. p. 35 - 493
- 22.-GILLILAND, S.E ., RICH,C.N. 1990. Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* grown at different pH. J. Dairy Sci. 73: 1187 - 1192
- 23.-GIRAUD, ERIC., LELONG, BERTRAND., RAMBUOLT, MAURICE. 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 96 - 9
- 24.-HAYNES, W.C., WICHERHAM , L.J., C,W. HESSELTINE. 1955. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Appl. Microbiol. 3: 361 - 368
- 25.-ICHIRO, CHIBATA. 1978. Immobilized enzymes. Research and develoment. Kodansha Scientific Books . Japan. p. 22 - 76
- 26.-HOUGH, J. S., BRIGGS, D. E. and STEVENS, R. 1971. Malting and Brewing Science. ed. Chapman and Holl., London. p. 741 - 803

- 27.-**JORGENSEN, A. 1948.** Microorganisms and Fermentation. Ed. C. Griffin and Co., London. p. 15 - 100
- 28.-**KENNES, C., DOBOURGUIER, H.C., ALBOGNAL, C. 1991.** Fermentation of citrate by *Lactobacillus plantarum* in the presence of yeast under acid conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**: 369 - 72
- 29.- **KLEYN, J., AND HOUGH, J. 1971.** The microbiology of brewing. Ann. Rev. Microbiol. **25**: 583 - 608
- 30.-**KUINES, C.; VEIGA, M.C.; DUBOUGUIERE, H.C. 1991.** Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism and glucose and citrate. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1046 - 51
- 31.-**JU, L. K., AND JO, C. S. 1988.** Correlation of cell volumen fraction with cell concentration in fermentation media. Biotechnol. Bioeng. **32**: 95 - 99
- 32.-**LEIDLER AND BUNTING . 1973.** " The chemical of enzyme action ", ed. Clarendon Press. Oxford , second edition. p. 413 - 461
- 33.-**Mc DONALD, L.C., FLEMING, H.P., HASSAN, H.M. 1990.** Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 2120 - 2124
- 34.-**M.M.C. TSENG. 1974.** Kinetics of growth of *Proteus vulgaris* and *Saccharomyces cerevisiae* in pure and mixed culture system, PHD thesis University of Toronto.
- 35.-**LYNCH, M. J., RAPHAEL, S.S., MELLOR, LESLIE D., SPARE, D. PETER., INWOOD, J. H. MARTIN. 1969.** Métodos de laboratorio, segunda edición, editorial Interamericana. México, D.F. p. 743-769
- 36.-**PEPPLER, H. J. 1970.** The Yeast, Vol. 3 (eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S.), Academic Press, London. p. 421 - 485
- 37.-**PIRT, JOHN S.1975.** Principles of Microbe and Cell Cultivation. Ed. Halsted® Press. New York, U.S. p. 143 - 276
- 38.-**PRESCOTT, CATE. SAMUEL., DUNN, GORDON. CECIL. 1962.** Microbiología Industrial. Aguilar s.a., de Ediciones. Madrid, España. p. 13 - 452
- 39.-**QUINTERO, RAMIREZ . RODOLOFO. 1990.** Ingeniería bioquímica. teoría y aplicaciones. Ed. Alambra Mexicana, S.A. de C. V. México, D.F. p. 115 - 131
- 40.-**RAINBOW, C. 1975.** Lactic acid bacteria in beverage and and food (eds. Carr, J.G., Cutting, C. V. and Whiting, G. C.), Academic Press London. p. 245

- 41.-RAINBOW, C. 1970. The Yeast, Vol. 3 (eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S.), Academic Press, London. p. 147
- 42.-RAINBOW, C. 1966. Wallerstein Labs. Common. 29: 5 - 12
- 43.-ROBINSON, R. A., BODILY, H., DEAN, F., ROBINSON., CHRISTENSEN, P. R. 1988. A suspension method to determine reuse life of chemical desinfectant during clinical use. Appl. Environ. Microbiol. 24: 158 - 164
- 44.-ROSE, SALLY A. 1985. A note on yeast growth in media used for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 59: 1153 - 1156
- 45.-SAUDEGREN, E. AND ENEBO, L. 1965. Development in fermentation technology Europ. Brewerys Conv. proc. p. 164 - 161
- 46.-SCHLEGEL, H. G. 1975. Microbiología general. Ediciones Omega, s.a.;Barcelona. p. 142 - 247
- 47.-STANTON, J. H. 1971. Sanitation techniques for the brewhouse, cellar and bottleshop. M.B.A.A. Tech. Quaterly 8: 148 - 152
- 48.-TSAU, JYA-LI., GUFFMANT, ARTHUR A., MONTEVILLE, THOMAS J. 1992. Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 891 - 894
- 49.-TSENG, CHING-PING., MONTEVILLE, THOMAS J. 1991. Enzyme activities affecting end product distribution by *Lactobacillus plantarum* in response to changes in pH and oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2761 - 2763
- 50.-TSENG, CHING-PING., MONTEVILLE, THOMAS J. 1992. Enzymatic regulation of glucose catabolism by *Lactobacillus plantarum* in response to pH shifts in a chemostat. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 777 - 781
- 51.-VISURI, K. AND KIRSOP, B.H. 1970. The influence of pH and selected cations on the fermentation of maltose and maltotriose. J. Inst. Brew. 76: 362 - 366
- 52.-WATSON, D. M. 1964. Culture and maintenance of lager yeast. Brewers Guardian. 93: 17 - 24
- 53.-WHITE, J. 1954. Yeast Technology. Wiley, J. & son's, New York. p 233 - 286

## **11. AGRADECIMIENTOS**

Muchas veces es difícil comprender que cualquier meta que se trace el ser humano en la vida, por muy sencilla que ésta sea, requiera de la ayuda de las gentes que están en su entorno, a veces por egoísmo o por orgullo no permitimos el acercamiento de la gente que gustosamente nos tiende la mano; yo como ser humano, no me hago exento de esta debilidad, afortunadamente, hay momentos en la vida, en la que ésta nos enseña el camino adecuado y por fortuna para mi, me pude dar cuenta de este gran error y gracias al apoyo y ayuda de personas que desinteresadamente me dieron consejos, he logrado terminar este pequeño trabajo de investigación, el cual tiene mucho significado para mi; espero que con mi desarrollo profesional de alguna manera corresponda a esa confianza que me han brindado. Quiero darle las gracias al M.C Sergio S. Fernández D., por su ayuda y consejos, así como también a las M.C. Martha Suárez y Teré Garza por su apoyo y confianza, al Dr. Alberto Salinas F. por su gran paciencia que ha tenido para hacia mi persona, además de brindarme apoyo en cada momento de mi vida profesional.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Atentamente**

---

**Jorge Chávez Contreras**

## 12. VITA

### Jorge Chávez Contreras

#### **ESCOLARIDAD:**

Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas  
U.A.N.L. ( 1993 - 1994 ).

Desarrollo de tesis para obtener el grado de maestro en ciencias con  
especialidad en Microbiología Industrial.

Facultad de Ciencias Biológicas de U.A.N.L ( Sep. de 1993 ).  
Curso de Biología Molecular Avanzada.

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey ( ITESM ).  
Campus Monterrey ( Jun. de 1993 ). Seminario de biotecnología aplicada  
al medio Ambiente.

Universidad Regiomontana ( Abr. de 1993 ). Curso de Cultivo de Tejidos  
Vegetales.

Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L ( 1976 - 1980 ). Obtención  
del título de Químico Farmacobiólogo mediante mención honorífica.

Instituto 18 de Marzo en Gómez Palacio Dgo., ( 1972 - 1975 ).  
Certificado de Preparatoria.

Instituto 18 de Marzo en Gómez Palacio Dgo., ( 1969 - 1972 ).  
Certificado de Educación Secundaria.

Escuela Presidente López Mateos Gómez Palacio Dgo., ( 1962 - 1968 ).  
Certificado de Educación Primaria.

#### **EXPERIENCIA PROFESIONAL :**

Investigador del ITESM en el Centro de Desarrollo Biotecnológico desde  
Junio de 1993 a la fecha.

Coordinador de la sección microbiológica de Cervecería Cuauhtémoc -  
Moctezuma en la Gerencia de Aseguramiento de la Calidad de Febrero de  
1984 a Abril de 1993.

Maestro investigador del Departamento de Microbiología de la Facultad de  
Ciencias Químicas de la U.A.N.L. de 1981 a 1984.

#### **DATOS PERSONALES:**

Mexicano, nacido en Gómez Palacio Dgo., el 10 de Feb. de 1956.

