



Inactivación de dos levaduras por medio de radiación ultravioleta de onda corta en combinación con reducción de actividad de agua

T. Hernández-Grajales*, E. Palou-García, A. López-Malo

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Fundación Universidad de las Américas Puebla. Sta. Catarina Martir, Cholula, Puebla. C.P. 72820. México

Resumen

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el efecto de la radiación ultravioleta de onda corta (UVC) sobre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii* suspendidas en sistemas modelo con diferentes actividades de agua (a_w) (0.99, 0.97, 0.95). Durante el tratamiento con radiación UVC, que se llevó a cabo a tres distancias distintas entre la muestra y la lámpara (1, 5, 10 cm), se evaluó la cinética de inactivación de las levaduras para llevar a cabo una comparación entre el comportamiento de cada una de éstas. Se observó que el tiempo requerido para disminuir la población de las levaduras por debajo del nivel de detección (< 10 UFC/ml) varía dependiendo de la a_w y de la distancia de la muestra a la lámpara UVC, el sistema modelo con a_w de 0.95, a 1 cm de distancia de la lámpara UVC, el más efectivo.

Palabras clave: radiación ultravioleta de onda corta, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, actividad de agua, sistema modelo.

Abstract

The main objective of this research was to evaluate the effect of short-wave ultraviolet (UVC) on yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* suspended in model systems with different water activities (w_a) (0.99, 0.97, 0.95). During treatment with UVC radiation, which was conducted at three different distances between the sample and the lamp (1, 5, 10 cm), the kinetics of inactivation of yeasts were assessed to carry out a comparison between the behavior of each of them. It was noted that the time required to reduce the yeasts population below the detection level varies depending on the w_a and the distance of the sample to the UVC lamp, requiring the least time to achieve total inactivation with the model system with w_a of 0.95, at a distance of 1 cm between the sample and the UVC lamp.

Key words: UV radiation, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, water activity, model system.

*Programa de Maestría en Ciencias de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: teresac.hernandezgs@udlap.mx

Introducción

En la actualidad, la aplicación de tratamientos térmicos y el almacenamiento a bajas temperaturas son los métodos de conservación de alimentos más comúnmente utilizados. Los procesos emergentes, que utilizan métodos físicos de destrucción microbiana y/o enzimática, aplicados a la conservación de alimentos sin los efectos colaterales de los tratamientos con calor, están siendo intensamente evaluados (López-Malo y Palou, 2004; López-Malo *et al.*, 2001; 2003). Además, se busca el uso simultáneo de diferentes métodos para disminuir la intensidad de los tratamientos.

Algunas tecnologías emergentes como la aplicación de altas presiones, pulsos eléctricos, pulsos magnéticos, ultrasonido de baja frecuencia y luz ultravioleta, se están estudiando como sustitutos de los tratamientos térmicos (Alzamora *et al.*, 2005; López-Malo y Palou, 2004); no obstante, la mayoría de éstas se encuentran todavía en estudio y su aplicación a alimentos industrialmente es, en muchos casos, aún incierta.

Dentro de los llamados procedimientos emergentes, se encuentra la irradiación de alimentos con radiación ultravioleta de onda corta (UVC); la cual ha sido reportada como un método efectivo para inactivar bacterias que contaminan agua y superficies de diversos materiales. A pesar de esto, la respuesta microbiana en alimentos a esta tecnología emergente está siendo recientemente investigada, por lo que el conocimiento del comportamiento de ciertos microorganismos que crecen en alimentos bajo el efecto de la radiación UVC ayudaría a implementar esta tecnología en la industria alimenticia.

La reducción de actividad de agua (a_w) en los alimentos también ha resultado ser una herramienta bastante efectiva para evitar y

reducir el crecimiento de microorganismos en éstos.

La combinación de factores o métodos combinados para la conservación de alimentos también está siendo evaluada. Se basa en inhibir el crecimiento microbiano o inactivar a los microorganismos inicialmente presentes, y en retardar o evitar las reacciones deteriorativas de alimentos, combinando los efectos de varios factores de preservación (Alzamora y López-Malo, 2002), los cuales, al utilizarse por sí solos como métodos de conservación, necesitan ser aplicados a niveles extremos causando, generalmente, una alteración de las características físicas, químicas y sensoriales del alimento. Los nuevos factores de conservación aplicados en combinación requieren de estudios serios y profundos sobre los efectos benéficos que tengan en los alimentos.

Por otro lado, las levaduras están involucradas en el deterioro de varios alimentos, particularmente aquellos que contienen altos niveles de azúcar (Banwart, 1981).

Por lo expuesto anteriormente, se consideró de gran importancia evaluar el efecto de la radiación UVC sobre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii*, suspendidas en sistemas modelo con diferentes a_w .

Materiales y métodos

1. Obtención de microorganismos y preparación del inóculo

Se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, cepas de las levaduras *S. cerevisiae* y *Z. bailii*. Las cepas se mantuvieron en cuñas de agar papa-dextrosa

(PDA) y se resembraron periódicamente (López-Malo, 1995). Para la preparación del inóculo, las levaduras se hicieron crecer en caldo maltosa Sabouraud (Merck, Darmstadt, Alemania) esterilizado a 121°C.

2. Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon 100 ml de los sistemas modelo utilizando como base caldo maltosa Sabouraud (Merck, Darmstadt, Alemania). Para tener sistemas modelo con a_w de 0.95 y 0.97 se ajustó el medio de cultivo utilizando como soluto una determinada cantidad de sacarosa comercial, de acuerdo a la ecuación de Norrish (1966). Para el correspondiente a a_w de 0.99 no se agregó ningún soluto al medio de cultivo. Los sistemas modelo se esterilizaron a 121°C y posteriormente se dejaron enfriar. Ya enfriados, los sistemas modelo se inocularon con cada una de las dos levaduras por separado, tomando dos asadas de las cuñas correspondientes a cada microorganismo.

3. Tratamiento con UVC

Se empleó una lámpara de radiación UVC (Germicidal Lamp G15T8 Sankyo Denki, Japan) de baja presión cuya longitud de onda mayoritaria es de 254 nm y cuya potencia inicial se reporta de 15 W. Se vertieron 10 ml de cada sistema modelo con su respectiva a_w y conteniendo el inóculo en cajas petri, siendo esta cantidad equivalente a un espesor de 4 mm del sistema. Se determinó una población inicial de 10^7 UFC/ml, aproximadamente. Después se trató por medio de la radiación UVC colocando las cajas a distintas distancias de la lámpara (1, 5 y 10 cm). El tratamiento se llevó a cabo durante siete tiempos diferentes; de 0 a 30 minutos en intervalos de 5 minutos, correspondiendo al control el sistema modelo con un tratamiento de cero minutos. Lo anterior se realizó por triplicado.

4. Conteo microbiano

Se tomó una muestra de 1 ml de cada uno de los sistemas modelo tratados, así como del control, y se sembró en agar papa-dextrosa (PDA). Las cajas petri se incubaron a 36 °C durante 48 horas (López-Malo, 1995). Despues se realizó el conteo en placa.

5. Análisis del comportamiento microbiano

Con los datos obtenidos del conteo microbiano se obtuvieron gráficas de supervivencia, en cuyo eje de ordenadas se representa el logaritmo decimal de la cantidad de microorganismos presentes al tiempo t de tratamiento sobre la cantidad inicial de microorganismos ($\log (N/N_0)$) y en el eje de abscisas el tiempo de tratamiento. Finalmente se realizó una comparación entre el comportamiento de cada una de las levaduras bajo el efecto de la radiación UVC.

Resultados y discusión

1. Efecto de la radiación UVC en *S. cerevisiae*

En cada sistema modelo se observó una disminución de la población microbiana de entre seis y siete ciclos logarítmicos, como consecuencia del tratamiento aplicado. Como ejemplo se presenta la disminución de la población de *S. cerevisiae* correspondiente al tratamiento del sistema modelo con a_w de 0.95, a las tres distancias de la lámpara de UVC (Fig. 1).

Se observó que en todos los casos se logra reducir la población de la levadura por debajo del nivel de detección (<10 UFC/ml). El tratamiento llevado a cabo con los demás sistemas modelo ($a_w = 0.97, 0.99$) también fue efectivo, presentándose un comportamiento en

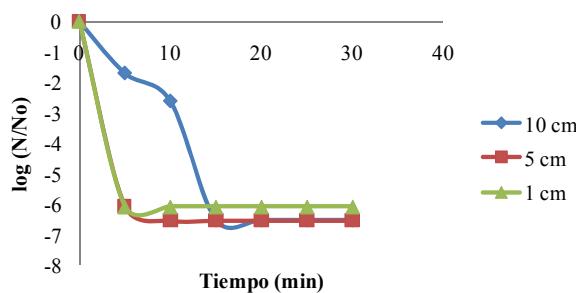


Fig. 1. Inactivación de *S. cerevisiae* en un sistema modelo con a_w de 0.95 a las tres distancias de la lámpara UVC en función del tiempo de tratamiento.

las curvas similar al que se representa en la Fig. 1. El tiempo requerido para lograr dicha reducción en la población microbiana disminuyó conforme la distancia y la a_w disminuyeron. Los ciclos logarítmicos que se lograron reducir y el tiempo que se requirió para obtener una población microbiana menor a 10 UFC/ml en cada caso pueden observarse en la Tabla I.

El efecto de la radiación UVC es mayor mientras más cerca se encuentra la muestra a la lámpara UVC, lo que concuerda con lo observado por Sommer *et al.* (1996), quienes mencionan que la intensidad de la radiación

UVC es mayor cuando la lámpara se encuentra a una menor distancia de la muestra a tratar; la reducción en la a_w también influye en la disminución de la población microbiana, ya que al inducir a un microorganismo a un factor de estrés, como lo es la a_w , se debilita su estructura haciéndolo más vulnerable a otro tratamiento de inactivación microbiana (Vermeulen *et al.*, 2008), como en esta investigación fue la radiación UVC. Debido a lo anterior, el menor tiempo de tratamiento se obtuvo con el sistema modelo con a_w de 0.95 a 1 cm de distancia de la lámpara UVC.

Se han realizado diferentes investigaciones en las últimas décadas sobre el efecto de la radiación UVC en varios microorganismos (Harris *et al.*, 1987). Algunas de estas investigaciones se han centrado en analizar el efecto que la radiación tiene sobre las levaduras, principalmente sobre *S. cerevisiae*. Sommer *et al.* (1996) trataron medios líquidos conteniendo a *S. cerevisiae*, logrando una reducción de cuatro ciclos logarítmicos de la población al aplicar radiación UVC. Sin embargo, la reducción microbiana obtenida

Tabla I. Ciclos logarítmicos reducidos de la población de *S. cerevisiae* en cada uno de los sistemas modelo y tiempo requerido para reducir la población microbiana por debajo del nivel de detección.

a_w	Dist (cm) ^a	Ciclos log ^b	Tiempo (min) ^c
0.99	10	6.91	25
	5	6.89	20
	1	6.83	5
0.97	10	6.89	25
	5	7.11	25
	1	6.84	5
0.95	10	6.35	15
	5	6.83	5
	1	6.06	5

^a Distancia de la muestra a la lámpara UVC

^b Ciclos logarítmicos reducidos

^c Tiempo requerido para reducir la población microbiana por debajo del nivel de detección (< 10 UFC/ml)

en el presente trabajo de investigación fue mayor, probablemente debido a la combinación de la radiación UVC con la reducción de a_w . Además, los resultados obtenidos en una investigación realizada por Vladislav *et al.* (2001), en la que se observa una importante inactivación de *S. cerevisiae*, coinciden en que dicha inactivación se favorece al combinar la radiación UVC con un tratamiento térmico; ya que la radiación UVC tiene un mayor efecto cuando existe algún otro tipo de factor de estrés al que se somete a la levadura, como la reducción de a_w .

Otro estudio (Legan, 1980) reporta reducciones de 7.3 ciclos logarítmicos para *S. cerevisiae* al tratar aire mediante radiación UVC conteniendo a esta levadura. Por lo que dicha radiación es un método efectivo para reducir la población microbiana. De acuerdo a Grocock (1984), mientras más translúcido sea un fluido, mayor será la penetración de la radiación UVC. Sin embargo, en este estudio las reducciones microbianas más importantes alcanzaron 7 ciclos logarítmicos a pesar de tratarse de un fluido menos claro que el aire.

2. Efecto de la radiación UVC en *Z. bailii*

El tratamiento llevado a cabo para inactivar a la levadura *Z. bailii* también fue efectivo, ya que se observó una población microbiana menor a 10 UFC/ml en cada uno de los sistemas modelo con las diferentes distancias estudiadas de la muestra a la lámpara (UVC). En la Fig. 2 se presenta la disminución de la población de *Z. bailii* correspondiente al tratamiento del sistema modelo con a_w de 0.97, a las tres distancias evaluadas.

Mediante el tratamiento con radiación UVC se logró una reducción microbiana de aproximadamente siete ciclos logarítmicos. La reducción de la población microbiana por debajo del nivel de detección se obtuvo a los diez minutos en el caso de la menor

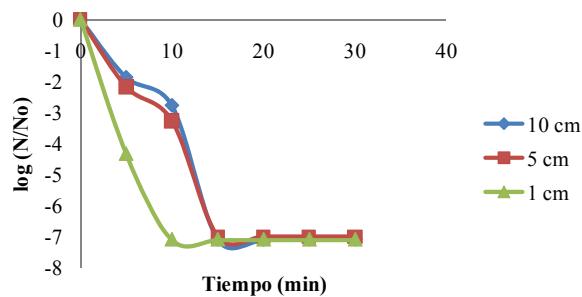


Fig. 2. Inactivación de *Z. bailii* en un sistema modelo con a_w de 0.97 a las tres distancias de la lámpara UVC en función del tiempo de tratamiento.

distancia (1cm) y a los quince minutos con las otras dos distancias (5 y 10 cm). Un comportamiento de las curvas similar se tiene para el tratamiento de los demás sistemas modelo. El tiempo que se requiere para lograr la inactivación total y los ciclos logarítmicos que se reducen en cada caso se muestran en la Tabla II.

La respuesta de esta levadura fue similar a la de la anterior, ya que con cada tratamiento se observó una población menor a 10 UFC/ml de *Z. bailii*, y el tiempo se modificó dependiendo de la distancia y de la a_w del sistema modelo. Se requirió un menor tiempo para lograr la reducción mencionada conforme se disminuyó la a_w y la distancia del sistema modelo a la lámpara UVC. Las condiciones con las que se obtuvo el menor tiempo de tratamiento fueron la distancia de 1 cm de la muestra a la lámpara UVC y la a_w de 0.95.

El hecho de que se logre reducir la población de *Z. bailii* por debajo del nivel de detección indica que la radiación UVC es un método efectivo para inactivar levaduras, debido a que en diferentes investigaciones se ha reportado a *Z. bailii* como una levadura resistente a varios tratamientos (Martorell *et al.*, 2007), ya que puede crecer a altas temperaturas y a altas concentraciones de azúcar, lo que dificulta el control de su crecimiento (Vermeulen *et al.*, 2008). Por lo

Tabla II. Ciclos logarítmicos reducidos de la población de *Z. bailii* en cada uno de los sistemas modelo y tiempo requerido para reducir la población microbiana por debajo del nivel de detección.

a_w	Dist (cm) ^a	Ciclos log ^b	Tiempo (min) ^c
0.99	10	6.99	30
	5	7.71	20
	1	7.70	10
0.97	10	7.97	15
	5	7.83	15
	1	6.89	10
0.95	10	6.95	15
	5	6.92	10
	1	6.88	5

^a Distancia de la muestra a la lámpara UVC

^b Ciclos logarítmicos reducidos

^c Tiempo requerido para reducir la población microbiana por debajo del nivel de detección (<10 UFC/ml)

anterior, podría proponerse como un método de conservación de alimentos.

3. Estudio comparativo entre las levaduras

Con el fin de comparar la cinética de inactivación entre las dos levaduras, *S. cerevisiae* y *Z. bailii*, se obtuvieron sus respectivas curvas de inactivación bajo las mismas condiciones, tanto de a_w como de distancia a la lámpara de UVC.

En la Fig. 3 se muestra la inactivación de las levaduras con una a_w de 0.99 y a 1 cm de distancia de la lámpara.

El tratamiento de radiación UVC fue efectivo, ya que se logró reducir la población de ambas levaduras por debajo del nivel de detección; sin embargo, para *Z. bailii* se requiere un tiempo de exposición a la radiación UVC mayor (10 min) que para *S. cerevisiae* (5 min). En tres casos de los nueve tipos de tratamientos diferentes se requirió el mismo tiempo para reducir la población microbiana por debajo del nivel de detección; en dos casos el tiempo de tratamiento requerido para lograr esa reducción fue menor al tratarse de la levadura *S. cerevisiae*, mientras que en cuatro casos se requirió un mayor tiempo de tratamiento al tratarse de la

levadura *Z. bailii*. Debido a que el número de casos en los que el tiempo requerido para reducir la población de la levadura *Z. bailii* por debajo del nivel de detección fue mayor, dicha levadura podría considerarse como la más resistente de las dos estudiadas, al tratamiento UVC. Existe poca información sobre el tratamiento de *Z. bailii* con radiación UVC. Sin embargo, Martorell *et al.* (2007) concluyen que *Z. bailii* es la levadura más resistente de entre cinco tipos evaluados utilizando distintos antimicrobianos. Por otro lado, Nielsen y Arneborg (2007) concluyeron que la resistencia de la levadura *Z. bailii* es mayor a la de *S. cerevisiae* al evaluar diferentes niveles de pH y diferentes tipos de antimicrobianos.

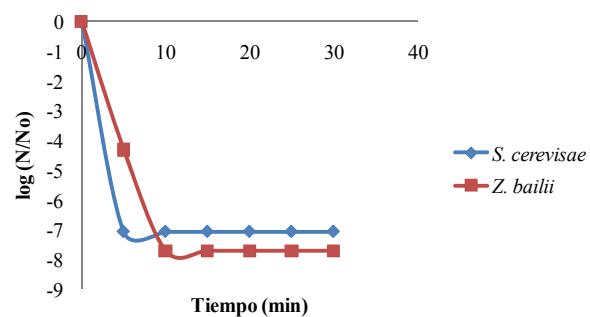


Fig. 3. Inactivación de dos levaduras con una a_w de 0.99 y a 1 cm de distancia de la lámpara UVC.

Conclusión

La combinación de la radiación ultravioleta de onda corta con la reducción de la a_w es un método de desinfección efectivo, ya que en todos los casos se logró reducir la población microbiana por debajo del nivel de detección (<10 UFC/ml). Las reducciones máximas alcanzadas fueron de 7 ciclos logarítmicos. En general la levadura más resistente al tratamiento fue *Z. bailii*. La efectividad del tratamiento de radiación UVC se aumenta en función de la reducción de la distancia entre la muestra y la lámpara y la disminución de la a_w . La a_w es un tipo de factor de estrés que favorece la disminución en la población microbiana al combinarse con la radiación UVC.

La combinación de dos técnicas de conservación redujo el tiempo de exposición de los sistemas modelo al tratamiento por lo que podría proponerse su aplicación en la industria alimenticia.

Referencias

Alzamora, S.M y López-Malo, A. 2002. Microbial behavior modeling as a tool in the design and control of processed foods. En: Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G. y Aguilera, J. M. (Eds.). *Engineering and Food for the 21st Century*. CRC Press. EE.UU. pp 631-650.

Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., Lopez-Malo, A., Welti-Chanes, J., Tapia, M.S., Palou, E. y Argaiz A. 2005. Combined Preservation Techniques for Fresh Fruit and Vegetables. En: Jongen, W. (Ed.). *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables*. Woodhead Publishing, Ltd., UK. pp 437-454.

Banwart, G.J. 1981. *Basic Food Microbiology*. 2a Ed. The AVI Publishing Co. Connecticut, EE.UU.

Grocock, N.H., 1984. Disinfection of drinking water by ultraviolet light. *J. Inst. Water Engineers and Scientists*. 38(2):163-172.

Harris, G. D., Adams, V. D., Sorenson, D. L., y Curtis, M. S. 1987. Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. *Water Res.* 21:687-692.

Legan, R.W. 1980. UV disinfection chambers. *Water and Sewage Works*. 1:56-61.

López-Malo, A. 1995. *Efecto de diversos factores sobre la capacidad antimicótica de vainillina*. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas-Puebla. México.

López-Malo, A., Palou, E., Arce-García, M.R., Beristain, L., Bermúdez-Aguirre, D. y Gómez-Díaz, J.J. 2001. Short-wave ultraviolet light irradiation effects on carrot juice. *2001 Institute of Food Technologists Annual Meeting*. New Orleans, LA. EE.UU.

López-Malo, A., Medrano, A. y Palou, E. 2003. Efectos de la radiación ultravioleta de onda corta en jugo de betabel. En: Fito, P., Mulet, A., Chiralt, A. y A. Andrés (Eds.). *Ingeniería de Alimentos: Nuevas Fronteras en el Siglo XXI. Tomo III: Ingeniería de Operaciones y Procesos*. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp 477-482.

López-Malo, A. y Palou, E. 2004. Ultraviolet light and food preservation. En: Cano, MP y Tapia, MS (Eds.). *Emerging Technologies for the Food Industry*. Marcel Dekker, Inc., New York, EE.UU. pp 405-421.

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T., Querol, A. 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*. 114(2): 234-242.

Nielsen, M. y Arneborg, N. 2007. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*. 24:101-105.

Norrish, R. S. 1966. An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *J. Food. Technol.* 1:25-39.

Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Heidenreich, E. y Kundi, M. 1996. Increased inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by protraction of UV irradiation. *Applied and environmental microbiology*. 62(6):1977-1983.

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

Vladislav, G., Jin Kyu, K., Anastasiya, V. y Zhurakovskaya, P. 2001. Mitotic recombination and inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* induced by UV-radiation (254 nm) and hyperthermia depend on UV fluence rate. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 478(2):169-176.