

RESISTENCIA TERMICA DE *Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra* EN JUGO DE NARANJA

**J. A. Barreiro,¹ J. L. Vidaurreta,² L. A. Boscán,³ S. Mendoza⁴
y E. Saiz⁵**

**Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y
Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela**

RESUMEN

El presente trabajo constituye un estudio sobre la resistencia térmica de dos levaduras (*Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra*) que frecuentemente se aíslan de muestras de jugo de naranja pasteurizados comerciales, recolectadas en el mercado venezolano. El experimento se desarrolló siguiendo el método del frasco, y aplicando temperaturas comprendidas entre 49.5 y 53.5°C,

Manuscrito modificado recibido: 9-7-81.

- 1 Director de la División de Ciencias Biológicas y Profesor Asociado, Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 80659, Caracas 108, Venezuela.
- 2 Profesor Asistente del Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos de la citada Universidad.
- 3 Profesor Titular de la Cátedra, quien en la actualidad se encuentra en la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- 4 Profesor Agregado del Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- 5 Ayudante de Investigación del Departamento en referencia.

a poblaciones iniciales de 1×10^5 células/ml de jugo. Se encontraron valores de $D_{50C}=3.4$ min y $z = 4.1^{\circ}C$ para *C. tropicalis* y de $D_{50C}=2.6$ min y $z = 9.8^{\circ}C$ para *R. rubra*, obteniéndose coeficientes de correlación lineal $r = 0.99$ y $r = 0.98$, respectivamente, para los datos experimentales.

INTRODUCCION

La resistencia térmica de los microorganismos no esporulados no ha sido estudiada en la literatura con el mismo detalle que la de los microorganismos productores de esporas. Los datos notificados son relativamente escasos y se refieren principalmente a microorganismos de importancia desde el punto de vista de la salud pública. El conocimiento de los parámetros que definen la resistencia térmica es esencial para el diseño y la especificación de procesos de pasteurización y de conservación por medio del calor en la industria de alimentos. En este sentido, tanto los microorganismos importantes desde el punto de vista de la salud pública, como los que son responsables del deterioro de los alimentos, deben ser considerados.

Las células vegetativas presentan menor resistencia térmica que las esporas (1). Thomas, White y Longree (2), indican que el valor z para células vegetativas frecuentemente se encuentra comprendido en el intervalo de $5.6 \pm 1.1^{\circ}C$. Riemann (3) informó valores de z cercanos a los $4.5^{\circ}C$ para *Salmonella spp.*, y de 4.7 a $7.3^{\circ}C$ para *Staphylococcus aureus*. De Freitas (4), por su parte, encontró valores de $D_{45C}=38.2$ min, $D_{48C}=2.01$ min y $D_{50C}=0.51$ min para *Vibrio parabaemolyticus*. El valor de z , calculado de los datos anteriores es de aproximadamente $2.5^{\circ}C$. Se constató una tendencia análoga para *Yersinia enterocolitica* en leche descremada (5).

Dos de los microorganismos que con más frecuencia se encuentran en los jugos de naranja vendidos comercialmente en Venezuela son las levaduras *Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra* (6), siendo estos microorganismos los responsables, en la mayoría de los casos estudiados, del deterioro de los jugos de naranja pasteurizados y, por consiguiente, los causantes de una considerable reducción de la estabilidad microbiológica de dichos jugos durante su distribución y almacenamiento. No se encontraron en la literatura datos relativos a la resistencia térmica de estos microorganismos en el mencionado sustrato, que permitan diseñar procesos de pasteurización adecuados.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros que definen la resistencia térmica de las levaduras *Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra*, utilizando como substrato jugo de naranja comercial producido en Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas empleadas en este trabajo fueron aisladas de jugos de naranja pasteurizados obtenidos a nivel de detallistas en Maracaibo y Caracas, Venezuela, respectivamente. Las dos cepas más comúnmente encontradas y que eran responsables del deterioro del producto fueron caracterizadas como *Candida tropicalis* y *Rhodotorula rubra* (6).

Manutención de las Cepas e Inóculos

Las levaduras antes mencionadas se mantuvieron en tubos de agar papa-dextrosa (Difco B13) y fueron incubadas a una temperatura de 25°C. El inóculo se preparó tomando una porción del cultivo primario con un asa de platino, cuando dicho cultivo se encontraba en la fase estacionaria de crecimiento, transfiriéndolo luego a una solución de agua peptonada al dos por ciento.

El inóculo fue estandarizado a un nivel de aproximadamente 1×10^7 células/ml, empleando técnicas turbidimétricas.

Se seleccionó la fase estacionaria de crecimiento debido a que es en dicha fase que los microorganismos presentan su máxima resistencia térmica (1).

Procedimiento Experimental

Los experimentos para la determinación de la resistencia térmica fueron realizados siguiendo el método del frasco recomendado por Stumbo (7). Para ello se utilizó un frasco de tres bocas (frasco de Woulff) de 500 ml. En una de las bocas se colocó un termopar de cobre-constantán a través de una empaadura de goma, el cual permitía la medición de la temperatura en el centro del frasco. En la boca central se adaptó —utilizando una empaadura de plástico— el eje de un agitador mecánico, el cual se acopló a un motor eléctrico situado en la parte superior del frasco. La tercera boca fue utilizada para la toma aséptica de las muestras, utilizándose para taparla un tapón de algodón y gasa.

El frasco, incluyendo el termopar, el eje del agitador y el tapón, fue esterilizado antes de cada prueba en un autoclave, a 121°C por 20 minutos.

Antes de comenzar cada experimento el termopar se conectó a un potenciómetro Leeds & Northrup (8690-2mv), con el cual se podía medir la temperatura en el interior del frasco y determinar sus variaciones. El tiempo se midió empleando un cronómetro con una apreciación de 1/100 min. El eje del agitador se acopló al motor y éste fue conectado a un reóstato con el fin de regular la velocidad de rotación del agitador, de forma que no ocurrieran salpicaduras de líquido en el interior del frasco.

El jugo de naranja pasteurizado que se utilizó en los experimentos fue comprado a nivel de detallistas, y luego fue repasteurizado a 80°C por 30 min. Se comprobó que este tratamiento era capaz de eliminar la flora bacteriana existente, dejando el jugo libre de microorganismos viables. El jugo así tratado fue mantenido asépticamente en un refrigerador a 4°C.

Se estudió el efecto del calor en la destrucción de los microorganismos a temperaturas de 46.0, 49.5, 50.5, 51.0, 51.5, 52.0 y 52.5°C, en ese orden. La temperatura se mantuvo constante mediante el empleo de un baño de circulación (2095-Masterline, Forma Scientific), el cual mantenía la temperatura en un rango de $\pm 0.02^\circ\text{C}$. Luego, una porción del jugo repasteurizado (350 ml) se transfería asépticamente al frasco de Woulff, y éste se sumergió en el baño de circulación, con agitación, hasta equilibrar las temperaturas del baño y del jugo.

En cada experimento el jugo fue inoculado con 3.5 ml del microorganismo objeto del estudio, a fin de obtener una población inicial aproximada de 1×10^5 células/ml. Para cada relación temperatura-tiempo se tomaron alícuotas de 1 ml en forma aséptica utilizando pipetas estériles cada 0.5 min, y cada minuto entre los 5 y los 10 minutos.

Las alícuotas así obtenidas fueron diluidas en agua peptonada al 20/o, manteniéndose en un baño de agua a 20°C, con el fin de detener el tratamiento térmico después de tomada la muestra. Luego, las diluciones fueron sembradas por duplicado en placas con agar papa-dextrosa e incubadas a 25°C durante 24 horas. Después del período de incubación se hizo un recuento de las colonias y se determinó el promedio de sobrevivientes.

Calculo de la Resistencia Térmica

Para cada uno de los microorganismos sometidos a estudio se

determinaron las curvas de tasa letal (log del número de sobrevivientes en función del tiempo) y los valores D a cada temperatura, siguiendo los procedimientos señalados en la literatura (1, 7).

Los valores D_{50C} y z fueron calculados de los datos de muerte térmica, graficando el log D en función de su correspondiente temperatura estudiada (8). Todas las curvas fueron ajustadas estadísticamente por el método de mínimos cuadrados, determinándose los coeficientes de correlación.

Análisis del Substrato

El jugo de naranja comercial utilizado como sustrato fue analizado para determinar la acidez titulable expresada como ácido cítrico, pH, sólidos totales y azúcares totales y reductores (9).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados correspondientes a las curvas de tasa letal a las temperaturas estudiadas (46.0, 51.0, 51.5, 52.0 y 52.5°C) para *Candida tropicalis* se presentan en la Tabla 1. Los correspondientes a *Rhodotorula rubra*, a temperaturas de 49.5, 50.5, 51.5, y 52.5°C se dan a conocer en la Tabla 2. En ambos casos se indican los valores D obtenidos a cada temperatura y la ordenada en el origen, pendiente y coeficiente de correlación lineal obtenidos a partir de los datos experimentales, al representar el logaritmo del número de sobrevivientes en función del tiempo de calentamiento.

Los datos de muerte térmica de ambos microorganismos se exponen en la Tabla 3. Según se aprecia, los datos indicados en las Tablas 1 y 2 fueron graficados y las pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación lineal, se calcularon mediante el método de mínimos cuadrados.

Se obtuvieron valores de D_{50C} = 3.4 min, y z = 4.1°C para *Candida tropicalis*, y D_{50C} = 2.6 min, y z = 9.8°C para *Rhodotorula rubra*.

A partir de los resultados obtenidos, es evidente que la resistencia térmica de ambos microorganismos es baja y comparable con la de otros microorganismos no esporulados. Cabe destacar, asimismo, que los parámetros de resistencia térmica determinados se ajustan solamente a las características fisicoquímicas del sustrato estudiado. Como se sabe, las variaciones en el pH, contenido de azúcar, población inicial de microorganismos, etapa de crecimiento,

TABLA 1

RESISTENCIA TERMICA DE *Candida tropicalis* EN JUGO DE NARANJA

Temperatura (°C)	D (min)	Ordenada en el origen	Pendiente (-min ⁻¹)	r*
46.0	31.1	4.3	0.03	0.67
51.0	2.6	4.8	0.32	0.93
51.5	1.3	5.1	0.76	0.98
52.0	0.98	4.2	1.02	0.99
52.5	0.78	4.7	1.28	0.99

* Coeficiente de correlación lineal de la curva log del número de sobrevivientes en función del tiempo de calentamiento.

TABLA 2

RESISTENCIA TERMICA DE *Rhodotorula rubra* EN JUGO DE NARANJA

Temperatura (°C)	D (min)	Ordenada en el origen	Pendiente (-min ⁻¹)	r*
49.5	2.8	6.0	0.36	0.97
50.5	2.5	4.6	0.40	0.99
51.5	1.9	5.6	0.54	0.94
52.5	1.4	5.1	0.70	0.86

* Coeficiente de correlación lineal de la curva log del número de sobrevivientes en función del tiempo de calentamiento.

nutrientes presentes, etc., pueden inducir variaciones en la resistencia térmica de los microorganismos. Las características fisicoquímicas del substrato sometido a ensayo se presentan en la Tabla 4. Recientemente la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) ha establecido el proyecto de norma para jugo de naranja pasteurizado (COVENIN 10:6-010), en donde se establecen los requisitos y los límites máximos y mínimos para los paráme-

TABLA 3

PARAMETROS DE RESISTENCIA TERMICA PARA *Candida Tropicalis*
y *Rhodotorula rubra* EN JUGOS DE NARANJA

	Ordenada en el origen (min)	D _{50C} (min)	z (min)	r*
<i>C. tropicalis</i>	12.8	3.4	4.1	0.99
<i>R. rubra</i>	5.5	2.6	9.8	0.98

* Coeficiente de correlación lineal de la curva de muerte térmica (log D en función de la temperatura).

TABLA 4

CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DEL SUBSTRATO
UTILIZADO (JUGO DE NARANJA)

Acidez titulable*	0.6 g/100 g
pH	3.1
Sólidos totales	13.1 g/100 g
Azúcares totales	12.8 g/100 g
Azúcares reductores	2.5 g/100 g

* Expresada como ácido cítrico.

tros fisicoquímicos que lo caracterizan. Es de esperar que cuando esta norma entre en vigencia, la uniformidad que se obtenga en la composición fisicoquímica de los jugos de naranja pasteurizados, de hecho incidirá en la reducción de la variabilidad en la resistencia térmica de los microorganismos implicados en el deterioro del producto.

SUMMARY

THERMAL RESISTANCE OF *Candida tropicalis* and *Rhodotorula rubra*
IN ORANGE JUICE

The thermal resistance of two yeasts (*Candida tropicalis* and *Rhodotorula rubra*) was studied. The yeasts were isolated from Venezuelan pasteurized orange juice obtained at retail level. The flask method was utilized, applying temperatures which ranged from 49.5 to 53.5°C to initial populations of 1×10^5 cells/ml of orange juice. Values of $D_{50C} = 3.4$ min and $z = 4.1^\circ C$ were found for *C. tropicalis*, and $D_{50C} = 2.6$ min and $z = 9.8^\circ C$ for *R. rubra*. Linear correlation coefficients of $r = 0.99$ and $r = 0.98$ were obtained, respectively, for the experimental data.

BIBLIOGRAFIA

1. Hersom, A. C. & E. D. Hulland. **Canned Foods, an Introduction to their Microbiology (Baumgartner)**. 5a. ed. (Chapter VIII). New York, N. Y. Chem. Pub. Co. Inc., 1964, p. 110-131.
2. Thomas, C. T., J. C. White & K. Longree. Thermal resistance of *Salmonellae* and *Staphylococci* in foods. *Appl. Microbiol.*, 14: 815-820, 1966.
3. Riemann, H. **Food-Borne Infections and Intoxications**. (Chapter XII). New York, N. Y., Academic Press, 1969, p. 497-500.
4. De Freitas-L., M. F. Resistencia térmica e caracterização de *Vibrio parahaemolyticus* por electroforesis em gel de sobrenadantes de culturas. *Colet. do Inst. de Tecnol. de Alim.*, 3: 369-423, 1969.
5. Hanna, M. O., J. C. Stewart, J. L. Carpenter & C. Vanderzant. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* in skim milk. *J. Food Sci.*, 42: 1134, 1977.
6. Mendoza, S., L. Montemayor, L. A. Boscán & J. A. Barreiro. Microflora en jugos de frutas pasteurizados venezolanos. Presentado en: **II Congreso Venezolano de Microbiología y X Jornadas Nacionales, Maracaibo, Venezuela, del 25 al 30 de marzo de 1979**.
7. Stumbo, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. (Chapter 8). 2nd ed. New York, N. Y., Academic Press, 1973, p. 97-99.
8. National Canners Research Laboratories. **Laboratory Manual for Food Canners and Processors**. Vol. 1. (Chapter 7). Westport, Conn., The AVI Pub. Co., 1968, p. 186-195.
9. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 12th ed. Washington, D. C., The Association, 1975, p. 395, 401, 409.