

Caracterización reológica y microbiológica, y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón

Salvador Garza Garza

I S B N: 84-89727-64-3

Depósito Legal: S. 54-98

Servei de Publicacions

Universitat de Lleida

*"Lo único que hacemos con las mejores
frutas es cambiarles el envase."
(Lema publicitario)*

**Dedicado a la memoria
de mi hermano Alfonso,
y a mis padres.**

ÍNDICE GENERAL

NOMENCLATURA

I INTRODUCCIÓN

1 SITUACIÓN DEL SECTOR DE LOS DERIVADOS DE FRUTA

2 EL CREMOGENADO Y SU ELABORACIÓN

2.1 ASPECTOS LEGALES

2.2 USOS DE LOS CREMOGENADOS

2.3 PROCESO DE ELABORACIÓN

2.4 ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL CREMOGENADO DE MELOCOTÓN

2.5 CARACTERÍSTICAS DEL CREMOGENADO DE MELOCOTÓN

3 PRINCIPALES PARÁMETROS Y COMPONENTES DE LOS DERIVADOS DE FRUTA

3.1 pH

3.2 ACTIVIDAD DE AGUA

3.3 NUTRIENTES

3.3.1 Hidratos de carbono (Primo, 1979)

3.3.2 Compuestos nitrogenados

3.3.3 Ácidos y vitaminas

3.3.4 Pigmentos

3.3.5 Pectinas y sólidos en suspensión

4 REOLOGÍA EN ALIMENTOS

4.1 CONCEPTO Y APLICACIONES

4.2 REOLOGÍA EN FLUIDOS ALIMENTARIOS

5 CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS FLUIDOS SEGÚN SU COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

5.1 FLUIDOS NEWTONIANOS

5.2 FLUIDOS NO NEWTONIANOS

5.2.1 Fluidos independientes del tiempo

5.2.2 Fluidos no newtonianos dependientes del tiempo

5.2.3 Fluidos no newtonianos viscoelásticos

6 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

6.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA

6.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN

7 MEDIDAS EN REOLOGÍA

7.1 MÉTODOS FUNDAMENTALES

8 PRINCIPALES MECANISMOS DE DETERIORO EN ZUMOS Y CREMOGENADOS

9 MICROFLORA AISLADA EN DERIVADOS DE FRUTA

10 MICROFLORA ALTERANTE DE LOS DERIVADOS DE FRUTA

10.1 ALTERACIONES BACTERIANAS

10.2 ALTERACIONES CAUSADAS POR MOHOS

10.3 ALTERACIONES POR LEVADURAS

11 MODELOS PREDICTIVOS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

11.1 TIPOS DE MODELOS MICROBIANOS

11.2 MODELO DE GOMPERTZ

12 MÉTODOS DE CONTROL DE LOS MICROORGANISMOS

12.1 CONSERVACIÓN QUÍMICA

- 12.2 PASTEURIZACIÓN
- 13 TERMORRESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS
 - 13.1 CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN TÉRMICA
 - 13.1.1 Velocidad de termodestrucción microbiana
 - 13.1.2 Valor z
 - 13.2 FACTORES QUE AFECTAN A LA TERMORRESISTENCIA
 - 13.2.1 Influencia genética. Tipo de microorganismo
 - 13.2.2 Edad de las células
 - 13.2.3 Fase de crecimiento
 - 13.2.4 Temperatura y medio de cultivo
 - 13.2.5 pH del medio de tratamiento
 - 13.2.6 Actividad del agua
 - 13.2.7 Composición del medio de tratamiento
- 14 EL PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO
- 15 MECANISMOS DE REACCIÓN DE MAILLARD
- 16 FACTORES QUE AFECTAN AL PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO
 - 16.1 TEMPERATURA Y DURACIÓN DEL TRATAMIENTO
 - 16.2 ACTIVIDAD DEL AGUA
 - 16.3 ACIDEZ DEL MEDIO
 - 16.4 COMPOSICIÓN DEL MEDIO
 - 16.4.1 Naturaleza del azúcar
 - 16.4.2 Aminoácidos y proteínas del medio
- 17 MEDIDA DE LA INTENSIDAD DEL PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO
 - 17.1 EVOLUCIÓN DEL COLOR
 - 17.1.1 El color y su medida
 - 17.1.2 Absorbancia
 - 17.2 VARIABLES COLORIMÉTRICAS
 - 17.2.1 Índice de pardeamiento
 - 17.3 HMF Y AZÚCARES
- 18 CINÉTICAS DE PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO
 - 18.1 MODELOS CINÉTICOS PARA LA EVOLUCIÓN DEL COLOR
 - 18.1.1 Cinética de orden cero
 - 18.1.2 Cinética de primer orden
 - 18.1.3 Cinética combinada
 - 18.2 MODELOS CINÉTICOS PARA LA FORMACIÓN DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)
 - 18.3 MODELOS CINÉTICOS PARA LA VARIACIÓN DE AZÚCARES
 - 18.3.1 Modelos cinéticos para la sacarosa
 - 18.3.2 Modelos cinéticos para las hexosas

II OBJETIVOS

III PLAN DE TRABAJO

IV MATERIAL Y MÉTODOS

1 MATERIAL

1.1 MUESTRAS ENSAYADAS

1.2 MICROORGANISMOS

1.3 DISOLVENTES Y REACTIVOS QUÍMICOS

1.4 PATRONES

1.5 APARATOS Y MATERIAL CIENTÍFICO ESPECÍFICO

2 MÉTODOS

2.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL CREMOGENADO DE MELOCOTÓN

2.1.1 Preparación de las muestras de cremogenado

2.1.2 Grados Brix

2.1.3 pH

2.1.4 Acidez total

2.1.5 Nitrógeno total

2.1.6 Índice de formol

2.1.7 Hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldehído) (HMF)

2.1.8 Azúcares

2.1.9 Actividad de agua (a_w)

2.1.10 Fibra

2.1.11 Pectinas

2.1.12 Pulpa

2.2 ASPECTOS REOLÓGICOS

2.2.1 Obtención de las muestras

2.2.2 Medidas reológicas

2.2.3 Cálculo de los parámetros reológicos

2.3 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

2.3.1 Toma de muestras

2.3.2 Medios de cultivo y tampones

2.3.3 Recuentos microbiológicos

2.3.4 Aislamiento y conservación de microorganismos

2.3.5 Identificación de microorganismos

2.3.6 Determinación del carácter potencialmente alterante de los microorganismos aislados

2.3.7 Seguimiento del comportamiento de las levaduras durante el almacenamiento del cremogenado de melocotón

2.3.8 Estudio de la termorresistencia de las levaduras

3 PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO

3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.2 TRATAMIENTO TÉRMICO

3.3 MEDIDA DEL COLOR

3.4 DETERMINACIÓN DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL Y DE AZÚCARES

3.4.1 5-hidroximetilfurfural

3.4.2 Azúcares

3.5 PROCESADO DE DATOS

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL CREMOGENADO DE MELOCOTÓN

2 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DEL CREMOGENADO DE MELOCOTÓN

2.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA

2.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN

2.3 EFECTO COMBINADO DE LA CONCENTRACIÓN Y TEMPERATURA

2.4 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS COMBINADOS

3 RECUENTOS MICROBIOLÓGICOS

4 CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA PRESENTE

<u>4.1 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR</u>	
<u>4.2 MICROFLORA BACTERIANA</u>	
<u>4.2.1 Bacilos Gram + esporulados</u>	
<u>4.2.2 Bacilos Gram -</u>	
<u>4.2.3 Cocos Gram +</u>	
<u>4.2.4 Bacterias lácticas</u>	
<u>4.3 MOHOS</u>	
<u>4.4 LEVADURAS</u>	
<u>5 MICROFLORA POTENCIALMENTE ALTERANTE DEL CREMOGENADO</u>	
<u>6 CONFIRMACIÓN DEL CARÁCTER POTENCIALMENTE ALTERANTE DE LAS LEVADURAS</u>	
<u>7 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE CREMOGENADO DE MELOCOTÓN</u>	
<u>7.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE LEVADURA UTILIZADAS</u>	
<u>7.2 MODELIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	
<u>7.3 VARIACIÓN DEL CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES Y DEL pH</u>	
<u>8 CINÉTICAS DE DESTRUCCIÓN TÉRMICA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	
<u>8.1 TIEMPO DE REDUCCIÓN DECIMAL (Dt)</u>	
<u>8.1.1 Cepa 26</u>	
<u>8.1.2 Cepa 99</u>	
<u>8.1.3 Cepa 204</u>	
<u>8.2 VALOR z</u>	
<u>8.3 INFLUENCIA DEL Ph Y DEL MEDIO EN LA TERMORRESISTENCIA</u>	
<u>9 EVOLUCIÓN DEL COLOR EN CREMOGENADO DE MELOCOTÓN</u>	
<u>9.1 ABSORBANCIA A 420 NM (A_{420})</u>	
<u>9.2 ESPECTROS DE REFLECTANCIA</u>	
<u>9.3 TRAYECTORIA DEL COLOR EN EL ESPACIO CIELAB</u>	
<u>9.4 LUMINOSIDAD</u>	
<u>9.5 DIFERENCIA DE COLOR</u>	
<u>9.6 DIFERENCIA DE CROMA</u>	
<u>9.7 ÍNDICE DE PARDEAMIENTO DE BUERA</u>	
<u>10 FORMACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL DURANTE EL TRATAMIENTO TÉRMICO</u>	
<u>11 EVOLUCIÓN DE LOS AZÚCARES DURANTE EL TRATAMIENTO TÉRMICO</u>	
<u>11.1 SACAROSA</u>	
<u>11.2 HEXOSAS</u>	
<u>VI CONCLUSIONES</u>	
<u>VII BIBLIOGRAFÍA</u>	

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que, directa o indirectamente, han colaborado en la realización de esta tesis, y en especial:

A Vicente Sanchis, quien me introdujo en el mundo de la investigación científica, inspirador y promotor de esta tesis, por su apoyo y estímulo durante todo este tiempo.

A Albert Ibarz, por toda su ayuda y por sus consejos y orientaciones en el campo de la reología y de las cinéticas de los pardeamientos no enzimáticos.

Al Departamento de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, principalmente a Santiago Condón, sin cuya desinteresada colaboración y experiencia no hubiesen sido posibles los ensayos de termorresistencia.

A mi hermano Luis, por su sagacidad informática y por la maquetación y formateo, durante largas noches de *gaupasa*; y a Rosa, por sus animosas arengas y acertadas sugerencias editoriales.

A Ximo, por su contribución entusiasta a los ajustes "gompertsianos", y por sus atinados dictámenes ortográficos, léxicos, sintácticos y semánticos.

A la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, por la concesión del proyecto ALI93-0770, dentro del cual se ha realizado parte de este trabajo.

A Indulleida, que ha facilitado las muestras de cremogenado necesarias; a José Lorente, por toda la colaboración prestada.

A los compañeros del Departamento de Tecnología de Alimentos.

NOMENCLATURA

- A** = Absorbancia.
A₀ = Absorbancia inicial.
A₁ = Constante modelo potencial (adimensional).
A₂ = Constante modelo exponencial (°Brix⁻¹).
A₄₂₀ = Absorbancia a 420 nm.
B = Coeficiente de ruptura tixotrópica (modelo de Weltmann).
B₁ = Parámetro del modelo de Hahn (Fluidos Tixotrópicos).
C = Concentración, contenido en sólidos solubles (°Brix).
C₀ = Concentración global ($C_{\text{HMF}} + C_{\text{H}}$) (ppm o moles/l).
C_{FR} = Concentración de fructosa (ppm o moles/l).
C_{FR}⁰ = Concentración inicial de fructosa (ppm o moles/l).
C_G = Concentración de glucosa (ppm).
C_G⁰ = Concentración inicial de glucosa (ppm o moles/l).
C_H = Concentración de hexosas ($C_{\text{G}} + C_{\text{FR}}$) (ppm o moles/l).
C_H⁰ = Concentración inicial de hexosas (ppm o moles/l).
C_{HMF} = Concentración de HMF (ppm o moles/l).
C_{HMF}⁰ = Concentración inicial de HMF (ppm o moles/l).
C_S = Concentración de sacarosa (ppm o moles/l).
C_S⁰ = Concentración inicial de sacarosa (ppm o moles/l).
D = Tiempo de reducción decimal (minutos).
D_t = Tiempo de reducción decimal para una temperatura T (minutos).
E_a = Energía de activación de flujo (Ec. de Arrhenius) (kJ/mol).
K = Índice de consistencia de flujo de la ley de la potencia (Pa.sⁿ).
K₀ = Constante o factor de frecuencia de la ec. de Arrhenius (Pa.s).
K_{0C} = Umbral de fluencia de la ec. de Casson (Pa^{0,5}).
K₁ = Constante modelo potencial (Pa.sⁿ °Brix^{-A₁}).
K₂ = Constante modelo exponencial (Pa.sⁿ).
K_C = Índice de consistencia de la ec. de Casson (Pa^{0,5}.s^{0,5}).
K_{C1} = Índice de consistencia para el modelo combinado 1 (Pa.sⁿ).
K_{C2} = Índice de consistencia para el modelo combinado 2 (Pa.sⁿ).
K_{C3} = Índice de consistencia para el modelo combinado 3 (Pa.sⁿ).
K_H = Índice de consistencia de flujo en ec. de Herschel- Bulkley (Pa.sⁿ).
K_i = Constante cinética de degradación estructural (s⁻¹).
K_t = Constante de velocidad en el modelo de Tiu y Boger (s⁻¹).
L = Luminosidad. Sistema Hunter.
L* = Luminosidad. Sistema CIELAB.
L*₀ = Luminosidad inicial. Sistema CIELAB.
N = Velocidad de giro o cizallamiento.
P = Valor de una propiedad determinada.
P₀ = Valor inicial de una propiedad determinada.
R = Constante universal de los gases perfectos (kJ/mol K).
S = Par de torsión.
T = Temperatura (°C o Kelvin).
X = Valor triestímulo del color. Sistema CIE.
Y = Valor triestímulo del color. Sistema CIE.
Z = Valor triestímulo del color. Sistema CIE.
X₀ = Valor triestímulo del color correspondiente al estímulo de referencia. Sistema CIE.
Y₀ = Valor triestímulo del color correspondiente al estímulo de referencia. Sistema CIE.

Z_0 = Valor triestímulo del color correspondiente al estímulo de referencia. Sistema CIE.
 a = Coordenadas de color. Sistema Hunter.
 a^* = Coordenadas de color. Sistema CIELAB.
 a^*_0 = Coordenadas de color inicial. Sistema CIELAB.
 b = Coordenadas de color. Sistema Hunter.
 b^* = Coordenadas de color. Sistema CIELAB.
 b^*_0 = Coordenadas de color inicial. Sistema CIELAB.
 k = Constante de velocidad de una propiedad determinada.
 k_0 = Constante cinética de orden cero.
 k_1 = Constante cinética de orden uno.
 k_1 = Constante en el modelo combinado 2 ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n/\text{°Brix}^{k_2}$).
 k_2 = Constante en el modelo combinado 2 (adimensional).
 k_3 = Constante en el modelo combinado 2 (kJ/mol)^{k₄}.
 k_4 = Constante en el modelo combinado 2 (adimensional).
 k_5 = Constante en el modelo combinado 3 ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$).
 k_6 = Constante en el modelo combinado 3 ($^\circ\text{C}^{-1}$).
 k_7 = Constante en el modelo combinado 3 ($^\circ\text{Brix}^{-1}$).
 k_8 = Constante en el modelo combinado 3 ($^\circ\text{C}^{-1}$).
 k_{FR} = Constante de degradación de la fructosa.
 k_G = Constante de degradación de la glucosa.
 k_H = Constante de degradación de hexosas.
 k_{HMF} = Constante de formación de HMF.
 k_S = Constante de degradación de la sacarosa.
 n = Índice de comportamiento al flujo (adimensional).
 n = Orden de reacción.
 r = Coeficiente de correlación.
 r^2 = Coeficiente de determinación.
 t = Tiempo (minutos o semanas).
 x = Coordenada tricromática del color. Sistema CIE.
 y = Coordenada tricromática del color. Sistema CIE.
 z = Coordenada tricromática del color. Sistema CIE.
 z = Incremento de temperatura para reducir D_t un ciclo logarítmico ($^\circ\text{C}$).
 α_1 = Constante en el modelo combinado 1 ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$).
 β_1 = Constante en el modelo combinado 1 ($^\circ\text{Brix}^{-1}$).
 ΔC^* = Incremento o diferencia de croma. Sistema CIELAB.
 ΔE^* = Incremento o diferencia de color. Sistema CIELAB.
 η = Viscosidad, viscosidad dinámica ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).
 η_a = Viscosidad aparente ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).
 η_{CD} = Viscosidad de deformación infinita o factor de frecuencia de la ec. de Arrhenius ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$).
 η' = Viscosidad plástica en el modelo de Bingham (Pa).
 K = Parámetro estructural del modelo de Tiu y Boger (adimensional).
 k_e = Parámetro estructural de equilibrio del modelo de Tiu-Boger (adimensional).
 λ = Longitud de onda (nm).
 λ = Tiempo de relajación.
 τ = Esfuerzo cortante (Pa).
 τ_0 = Umbral de fluencia o esfuerzo cortante inicial (Pa).
 τ_e = Esfuerzo cortante de equilibrio (Pa).
 $\dot{\gamma}$ = Velocidad de deformación (s^{-1}).

I Introducción

1 Situación del sector de los derivados de fruta

A partir de los años 60 el desarrollo de la fruticultura en España experimentó una gran expansión hasta el punto de adquirir una importancia significativa respecto a otros sectores agrarios.

Según datos del Anuario de Estadística Agraria 1992 (MAPA, 1994), en el año 1989 España tenía una superficie agraria útil (SAU) de 24.740.500 ha, de la cual se dedicaba a los cultivos leñosos un total de 3.875.500 ha. En Cataluña, de una superficie agraria útil de 1.106.000 ha, se dedicaron un 33% a cultivos leñosos, los cuales supusieron el 40% del valor de la producción final agrícola (DARP, 1993).

En lo referente al cultivo del melocotón, a nivel estatal, se observa cómo la superficie dedicada a este cultivo ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años, pasando de las 48.000 ha cultivadas en 1980 a las 77.700 ha en 1992, es decir, en los últimos doce años se ha producido un aumento en la superficie cultivada de melocotón del 62%. Este aumento en la superficie de cultivo, unido a la utilización de nuevas variedades más productivas y a técnicas de cultivo más modernas ha provocado que la evolución en la producción de melocotón haya sido muy notable, pasando de las 387.000 toneladas (t) en 1980 a las 1.024.000 toneladas producidas en 1992, es decir un incremento en la producción del 165% (MAPA, 1994).

Al contrario que ocurre con la manzana y la pera, la producción de melocotón no está concentrada geográficamente, sino que son varias las regiones productivas con un peso importante, siendo las más destacadas Aragón, Cataluña y Murcia, con una participación de alrededor del 25 % cada una, y la Comunidad Valenciana y Andalucía, con una participación del orden del 8 % cada una.

En Cataluña, en 1992, la producción de melocotón (254.255 toneladas) supuso un 23% del total de la producción de fruta fresca, destacando la provincia de Lleida con un 56 % de la superficie y un 58 % de la producción total de melocotón en Cataluña. Dentro de la provincia de Lleida, tanto la superficie cultivada como la producción se concentran casi en su totalidad en la comarca del Segriá, que representa un 90% (DARP, 1993).

Una vez expuestos los datos, queda de manifiesto la importancia que, a nivel estatal, tiene la provincia de Lleida y más concretamente la comarca del Segriá tiene dentro de la producción de melocotón.

El espectacular aumento en la producción de melocotón, ha provocado en los últimos años una saturación del mercado en fresco, donde sólo encuentra salida la fruta de mejor calidad. Todo esto ha traído aparejado el consiguiente descenso en las cotizaciones de esta fruta. Así pues, en este contexto, y si además añadimos el hecho de que la mayoría de las variedades de melocotón son de conservación limitada, parece razonable desviar parte de la producción hacia una transformación industrial, retirando del mercado productos de calidad deficiente y de difícil venta. Así, en el año 1992 el 27% de la producción total de melocotón en España, fue dedicada a la transformación industrial (MAPA, 1994).

En Cataluña, tradicionalmente, la industria transformadora de fruta había sido mínima, pero en los últimos años ha experimentado un notable desarrollo, destacando las industrias dedicadas a la producción de semielaborados como pastas y concentrados de fruta destinados a la elaboración de zumos.

Actualmente, en la comarca de Lleida hay ubicadas cinco industrias dedicadas a la transformación de fruta dulce, y se estima que la cantidad de materia prima transformada por estas industrias durante el año 1992 fue de 76.100 t/año de manzana, 24.430 t/año de pera y

32.000 t/año de melocotón. Entre los diferentes productos elaborados destacaron por su volumen de producción el cremogenado de melocotón (18.800 t) y el zumo concentrado de manzana (8.500 t). La producción de cremogenado de manzana con 1.500 t, fue más reducida (COCI de Lleida, 1993).

La mayor parte de los alimentos fluidos derivados de frutas se comercializan en forma de zumos o néctares. La demanda de zumos de fruta ha experimentado un fuerte aumento en los últimos años.

A principios de los ochenta España ocupaba el último lugar de Europa Occidental en cuanto a consumo de zumos se refiere. Pero a partir del año 1982 el mercado de los zumos comienza a sufrir una verdadera transformación. El desembarco en España de multinacionales alimentarias y la entrada en el sector de los derivados de fruta de grandes empresas nacionales del sector lechero se reflejó en el mercado, de forma que a finales del año 1983 se habían consumido 119 millones de litros de zumos y néctares, lo que suponía un incremento del 8,2% con respecto al año anterior. En la década de los 80 la evolución de este aumento fue espectacular, experimentando un crecimiento medio anual del 30%. Así, en 1987 el mercado se situaba en 208 millones de litros y en 1990 ya era de 449 millones. Actualmente, los datos más recientes confirman las previsiones de que el mercado de zumos y néctares español se encuentra en los inicios de su madurez con crecimientos cada vez más moderados. En 1992 el crecimiento fue del 15% y en 1993 creció sólo un 5%, alcanzándose la cifra de 618 10⁶ litros. (Alimarket, 1994).

Para el caso concreto de los derivados del melocotón, desde 1989, la participación de los zumos de melocotón y sus mezclas en las ventas y consumo total del mercado de zumos se ha estabilizado entre un 25 y un 27%. Mayor representación tiene el melocotón dentro del mercado de néctares, situándose desde 1990 en valores en torno al 43%.

2 El cremogenado y su elaboración

2.1 Aspectos legales

Por el Real Decreto 1650/1991, de 8 de noviembre, se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros productos similares, que viene a modificar, al tiempo que se adapta a las directivas comunitarias, la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados, que regía en España desde 1983 (BOE, 1991).

En el artículo 2 del Título Primero, define el puré, pulpa o cremogenado de la manera siguiente:

Puré o pulpa o cremogenado de fruta.- Es el producto susceptible de fermentación pero no fermentado obtenido mediante molturación o tamizado de la parte comestible de frutas, enteras o peladas sin eliminar el zumo.

También en el mismo artículo define el ***puré o pulpa o cremogenado concentrado de fruta concentrado*** como: *el producto obtenido a partir del puré, la pulpa o el cremogenado de fruta eliminando mediante procedimientos físicos una parte del agua que lo constituye.*

En el Título III, referente a Materias primas y otros ingredientes señala las características que debe reunir la fruta a partir de la cual pueden elaborarse los zumos de frutas y otros productos similares de la manera siguiente: la fruta, fresca o conservada por el frío, sana, desprovista de alteración, con todos sus componentes esenciales para la fabricación de zumos o néctares de frutas en el grado de madurez apropiada.

2.2 Usos de los cremogenados

Los cremogenados de frutas como elaborados casi integrales (salvo huesos, semillas y otras partes duras o defectuosas) con consistencia cremosa han alcanzado una gran importancia económica en la industria alimentaria actual, mostrando un gran futuro comercial ya que son la base a partir de la cual se elaboran una amplia gama de productos finales como son:

- los zumos de fruta con pulpa y los néctares de fruta.
- mermeladas.
- alimentos infantiles (baby foods).

El uso de los cremogenados como base para la elaboración de los productos mencionados anteriormente presenta una serie de ventajas bien definidas frente al método tradicional de utilizar la fruta como materia prima, ya que permite:

- reducir costes de almacenamiento, por reducción de volumen.
- reducir costes de transporte.
- ampliar el tiempo de conservación, ya que se reducen las posibles alteraciones por microorganismos.

2.3 Proceso de elaboración

En general, el proceso de elaboración de un cremogenado de frutas comprende las siguientes etapas:

1. Recepción

La fruta fresca llega a la industria normalmente envasada en grandes cajas de madera o "palots" que son vaciados en una tolva llena de agua. Esto permite amortiguar los golpes en la fruta durante el vaciado y a la vez sirve para realizar un primer prelavado de la fruta.

2 Primera selección

Se realiza por simple apreciación visual y/o por medida del contenido en azúcares simples de la fruta recién llegada, se separan las partidas verdes, que serán retenidas hasta que se maduren y su contenido en azúcares sea el adecuado para garantizar la obtención de un cremogenado con características idóneas.

3 Primer lavado

Esta operación tiene lugar en un cilindro rotatorio provisto de duchas de agua a presión. Se hace circular la fruta por su interior lo que provoca el desprendimiento de una parte de la suciedad que la fruta puede llevar.

4 Segundo lavado

Se realiza en un baño de agua fría a la que se le ha adicionado un producto desinfectante. Suelen utilizarse concentraciones de hipoclorito sódico del orden de 0,3 a 1,6 ppm. Este producto tiene el inconveniente de ser corrosivo de buen número de metales, lo que puede provocar daños en el material de la línea de proceso. En este segundo lavado, además de eliminar parte de la suciedad, se persigue reducir significativamente la contaminación microbiana superficial de la fruta.

5 Tercer lavado

En este caso el lavado se efectúa en un baño de agua caliente con borboteo intenso de aire insuflado por toberas situadas en la parte inferior de la cuba de lavado. El borboteo de aire produce una agitación del agua, que facilita el rozamiento entre las frutas eliminando gran parte de la suciedad que todavía puedan contener.

6 Segunda selección

Se hacen pasar las frutas mediante una mesa con superficie deslizante, por delante de

unos operarios que eliminan las frutas podridas y las partes defectuosas o ligeramente podridas de las frutas mayoritariamente sanas. También se separaran elementos extraños, como trozos de madera procedentes de los envases, latas u otros objetos que podrían provocar desperfectos en la maquinaria.

7 Deshuesado

Se realiza en una máquina provista de dos rodillos, uno de caucho y otro metálico, a través de los cuales se obliga a pasar la fruta. El fruto se rompe, y se desprende la pulpa. Los huesos quedan adheridos en el rodillo de caucho, del cual son separados mediante un rascador metálico. En otra máquina se les extraen los restos de pulpa que aun tuvieran y son eliminados como subproducto de la línea principal.

8 Trituración

La trituración se realiza en trituradores especiales que forman una pasta base del cremogenado. Después de la trituración se suele añadir un antioxidante, generalmente ácido ascórbico en proporciones de 200 a 600 ppm.

9 Inactivación enzimática

Se realiza por tratamiento térmico de la pasta a unos 90-95 °C durante 3 minutos. Este tratamiento puede realizarse en intercambiadores de calor de carcasa y tubos, alimentados por vapor de agua sobrecalentado. El calentamiento de la pasta, además de inactivar las enzimas de la fruta, consigue una reducción muy importante de la microflora propia de la fruta. Es muy importante que esta etapa se realice inmediatamente después de la trituración para prevenir pardeamientos enzimáticos, que tienen lugar en intervalos cortos de tiempo.

10 Tamizado de la pasta

Esta operación se realiza en dos etapas. En la primera, el producto caliente se hace pasar por unos tamices con un diámetro de orificio aproximado de 1 mm. Las partículas que no pasan a través del tamiz, generalmente pedúnculos de la fruta, son eliminadas como subproducto.

Para el acabado del producto se realiza un segundo tamizado a través de tamices cuya luz de malla puede variar de 0,4 a 0,9 mm, en función de la consistencia deseada para el producto final. Las partículas que quedan retenidas en esta fase son en su mayor parte trozos de la epidermis de los frutos.

Tras esta etapa se realiza, en aquellos casos en los que es necesario, una corrección del contenido de azúcares simples de la pasta, mediante la adición de zumo concentrado, despectinizado y clarificado o de cremogenado concentrado de la misma fruta.

11 Estabilización térmica

Generalmente se realiza en un intercambiador de placas, alimentado con agua glicolada fría, rebajando la temperatura de la pasta a unos 60-65 °C con la finalidad de reducir la evaporación de aromas en la siguiente etapa.

12 Homogeneización de la pasta

Esta operación se realiza en tanques cilíndricos de gran capacidad (20.000 litros o más) provistos de un agitador lo suficientemente efectivo como para lograr una adecuada homogeneización de la pasta. Estos tanques también sirven de tanques pulmón reguladores en proceso de desaireación.

13 Desaireación de la pasta

Con la desaireación de la pasta se pretende eliminar el oxígeno presente en la misma, ya que podría actuar sobre los taninos, aceites esenciales y lípidos, originando modificaciones del sabor y del color, además de causar pérdidas de vitamina C (Cardona *et al.*, 1992). La presencia de oxígeno en la pasta también podría favorecer el desarrollo de ciertos microorganismos.

La pasta se introduce en el desaireador a 63 °C y se pulveriza en condiciones de vacío

relativo (presión absoluta 0,24 kg/cm²). Los vapores extraídos del desaireador arrastran consigo gran cantidad de sustancias aromáticas naturales, por lo que son condensados y devueltos a la pasta.

14 Pasteurización de la pasta

Se realiza en intercambiadores de placas utilizando como fluido calefactor vapor de agua sobrecalentado. Se realiza un tratamiento térmico de 45 segundos de duración a la temperatura de 95-97 °C, o de 105-107 °C, en función del pH del producto. Seguidamente, la pasta, que ya puede denominarse cremogenado, se enfría hasta 23-25 °C en otro intercambiador de placas alimentado con agua glicolada.

15 Almacenamiento y envasado

El cremogenado puede almacenarse en tanques con capacidades de 25 a 60.000 litros, con atmósferas inertes, generalmente de nitrógeno, y mantenidos en el interior de almacenes refrigerados. Otra forma de envasado y almacenamiento, cada vez más utilizada, es en los llamados "bag in box", bolsas de 200-250 litros de capacidad, compuestas de cinco láminas de PVC y una de aluminio, envasadas asépticamente y cerradas al vacío que se introducen en bidones metálicos que permiten su paletizado, facilitando así su manejo y almacenamiento.

[Figura 1-1](#)

2.4 Aspectos fundamentales del cremogenado de melocotón

Después de describir el proceso de elaboración de los cremogenados resulta esencial destacar los aspectos de este producto que, por su especial incidencia en el propio proceso o en la calidad final del producto, es necesario conocer. Dadas las características propias del proceso y del mismo cremogenado los aspectos más destacables son: la reología, el aspecto microbiológico y los fenómenos de pardeamiento no enzimático.

Desde el punto de vista del proceso resulta imprescindible una adecuada caracterización reológica del cremogenado de melocotón. A lo largo de su elaboración este producto es sometido a toda una serie de manipulaciones y tratamientos como circulación a través de tuberías y equipo de proceso; tratamientos de calentamiento, enfriamiento y pasteurización en las que tiene lugar una transferencia de calor; y otras operaciones como tamizado, homogeneización y desaireación. En todas estas operaciones las características reológicas del cremogenado de melocotón van a desempeñar un papel fundamental.

El conocimiento de ciertos aspectos microbiológicos como la caracterización de la microflora presente en el cremogenado de melocotón, la determinación e identificación de los microorganismos más perjudiciales y su comportamiento durante la pasteurización y el almacenamiento, van a resultar esenciales desde el punto de vista higiénico y de conservación del producto.

Por último, otro aspecto de especial importancia es el pardeamiento no enzimático. Los tratamientos térmicos a que se ve sometido el cremogenado durante su elaboración, generalmente, inactivan las enzimas evitando así todas las consecuencias no deseadas que éstas pudieran ocasionar. Sin embargo, estos mismos tratamientos no sólo no evitan las reacciones de pardeamiento no enzimático sino que las favorecen, ocasionando un posible deterioro de las propiedades organolépticas, y con ello de la calidad del cremogenado.

2.5 Características del cremogenado de melocotón

Las especificaciones analíticas que normalmente siguen las industrias que producen cremogenado de melocotón son:

Físico-químicas:

Sólidos solubles:	mínimo 11%
Acidez:	0,45-0,80% (expresado como ácido cítrico).
pH:	3,6 ± 0,3
Vitamina C:	mínimo 200 ppm
Índice de formol:	mínimo 20

Microbiológicas:

Recuento total:	inferior a 10.000 pfc/g
Hongos y levaduras	inferior a 10.000 pfc/g

3 Principales parámetros y componentes de los derivados de fruta

En este apartado se incluye una descripción de los principales parámetros y componentes de los derivados de frutas en general y del melocotón, y por tanto de su cremogenado, en particular, que pueden ser de interés en la evolución de la microflora y reacciones objeto de esta trabajo. Los datos que se citan sólo pueden considerarse como orientativos ya que, la composición de las frutas depende de numerosos factores.

3.1 pH

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, el almacenaje y la distribución.

Las frutas, que son la materia prima fundamental para la elaboración de los zumos y cremogenados, tienen normalmente valores de pH ácidos, comprendidos entre 2,0 para el limón y la lima, y 4,5 para el tomate, debido a su gran contenido en ácidos orgánicos. En el melocotón los valores de pH oscilan entre 3,5 y 4,0. Los concentrados de frutas y los cremogenados, que sirven para la elaboración de zumos y mermeladas, tienen el mismo margen de pH (Sand, 1973).

Zemel *et al.* (1990) afirman que existe una correlación entre el pH y la estabilidad de los zumos, ya que este parámetro ejerce una influencia significativa sobre el crecimiento microbiano limitando el posible desarrollo de numerosos gérmenes patógenos. Si a ello se suma el efecto del tratamiento térmico a que se someten y el tipo de envasado, se pueden considerar los zumos como productos seguros desde el punto de vista de la alteración microbiana por gérmenes patógenos (Cardona *et al.*, 1992).

3.2 Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) está íntimamente relacionada con las propiedades físicas, químicas y biológicas de los alimentos y juega un papel muy importante en su estabilidad (Reid, 1992), ya que influye notablemente en la velocidad de las reacciones de alteración de los alimentos (Labuza, 1980; Rockland y Nishi, 1980). Alteraciones específicas en el color, aroma, sabor, textura y en la aceptabilidad de un alimento, crudo o procesado, han sido asociadas a cambios de a_w relativamente pequeños. Muchas de las reacciones involucradas en la reacción de Maillard consisten en deshidrataciones y rehidrataciones sucesivas, por lo que el agua misma es uno de los reaccionantes (Nuñez y Laencina, 1990).

La actividad de agua de los zumos y cremogenados viene determinada por su contenido en sólidos solubles, principalmente azúcares. Dichos niveles de azúcar suelen

oscilar, en los zumos y cremogenados no concentrados, entre el 5 y el 15 % en peso, es decir, entre 5 y 15 °Brix lo que implica que la actividad de agua tome valores altos, por encima de 0,98, que favorecen el desarrollo microbiano, ya que, aunque cada microorganismo tiene una actividad de agua crítica por debajo de la cual no puede desarrollarse, el valor óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos se sitúa entre 0,92 y 0,99. Así, las bacterias, entre las que se incluyen las patógenas, prácticamente no pueden crecer cuando los valores de la actividad de agua están por debajo de 0,85-0,90. Los mohos y levaduras, en cambio, son más tolerantes, pudiendo crecer a valores de actividad de agua mucho más bajos, de hasta 0,6 (Beuchat, 1983a; Chirife y Buera, 1994).

3.3 Nutrientes

3.3.1 Hidratos de carbono (Primo, 1979)

El contenido en carbohidratos de los zumos y cremogenados es alto y está constituido fundamentalmente por hexosas fácilmente metabolizables (como glucosa y fructosa), pentosas y pectinas. Los principales monosacáridos en el melocotón son la glucosa y la fructosa. En general, es mayor la proporción de glucosa que la de fructosa, siendo sus contenidos, con respecto al total de la fracción comestible de la fruta, de 1,47 y 0,96 g por 100 g respectivamente. Cabe destacar su contenido en sacarosa, un 6,66 % que es notablemente superior que el de los azúcares reductores. Otros azúcares que se encuentran en menor proporción son la xilosa, la arabinosa y el sorbitol.

3.3.2 Compuestos nitrogenados

Con frecuencia estos productos contienen nitrógeno, pero en niveles muy bajos, y aproximadamente alrededor del 60 % se encuentra en forma de aminoácidos libres. En el melocotón su contenido se sitúa entre 0,3 y 0,9 % del total de la fracción comestible. La mayor parte de la fracción proteica está constituida por enzimas, las cuales son inactivadas por la acción del calor durante el procesado de las frutas.

Los aminoácidos libres constituyen un promedio de un 50 % de la fracción de los compuestos nitrogenados solubles. En el melocotón algunos de los aminoácidos presentes son los ácidos γ -aminobutírico, aspártico, glutámico, la α -alanina y la glutamina entre otros.

3.3.3 Ácidos y vitaminas

El contenido en ácidos orgánicos es también elevado y tiene una gran influencia en el valor del pH. Muchas levaduras y hongos pueden utilizar los ácidos orgánicos como fuente de carbono en condiciones aeróbicas. Los principales ácidos orgánicos en el melocotón son el málico, el cítrico y el quínico (en la piel). El ácido málico es el predominante, aunque también se encuentran presentes, en pequeñas concentraciones, otros ácidos como el clorogénico, el galacturónico, el mícico y el succínico.

Las principales vitaminas aportadas por las frutas son las vitaminas A y C. La concentración de ácido ascórbico en el melocotón es de 9 a 76 mg/100 g, aunque en los productos elaborados este valor es mucho más reducido a no ser que se haya añadido, ya que además de su carácter nutritivo, esta sustancia contribuye a mantener la estabilidad del color y del sabor.

3.3.4 Pigmentos

El color de las frutas se debe a los pigmentos localizados en los plastos, vacuolas y en el líquido citoplasmático de las células. Los pigmentos más característicos pertenecen a cuatro grandes grupos: las clorofilas, los flavonoides, las antocianinas y los carotenoides.

La pigmentación de la piel en la mayoría de frutos va variando durante el período de crecimiento y durante la maduración. La clorofila es el pigmento verde presente en los frutos jóvenes. A medida que las frutas maduran se produce un viraje de color, como consecuencia de la desaparición de la clorofila y de la formación de nuevos pigmentos. En los melocotones cuando se alcanza la madurez, la clorofila desaparece casi por completo. La estructura química de la molécula de clorofila es muy compleja y fácilmente alterable por diferentes agentes físicos y químicos (Clydesdale y Francis, 1985).

Las antocianinas son glucósidos formados por una molécula de antocianidina (aglucon) unida a un carbohidrato. La antocianidina más frecuente en las distintas variedades de melocotones, es la cianidina; y los azúcares que comúnmente se pueden encontrar formando parte de las antocianinas son glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa.

En general, las antocianinas se encuentran en la piel, pero también se pueden encontrar en la porción carnosa de las frutas y se hallan disueltas en el jugo celular. Sus colores son rojo, azul o violeta. El color de cada antocianina depende de su estructura química, del pH al que se encuentra y de la presencia de sales con las que interaccione. Estos pigmentos son poco estables, la presencia de oxígeno, la temperatura, tanto durante el procesado como en el almacenamiento, y otros factores como la luz y el pH influyen en la pérdida del color de las mismas (Villota y Hawkes, 1992). Los productos de degradación de los azúcares, en particular el furfural y el 5-hidroximetil-furfural, también aceleran la degradación de las antocianinas (Markakis *et al.*, 1957).

Los flavonoides tienen una estructura química similar a las antocianinas, y normalmente se encuentran junto con ellas en los frutos. Los azúcares unidos a los aglucones son, generalmente, glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa, y en algunos casos, es el disacárido rutinoso. En general los flavonoides son de color amarillo y naranja, pero participan muy poco en la coloración de las frutas (Primo, 1979). Son más estables que las antocianinas al calor y a las reacciones de oxidación.

Los carotenoides son responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas. En las frutas se encuentran en forma libre, disueltos en lípidos, como ésteres, o combinados con azúcares o proteínas y generan diferentes colores según la manera en que interaccionen. Los melocotones son particularmente ricos en carotenoides, 27 mg/kg de peso húmedo. Los carotenoides mayoritarios en melocotón son la violaxantina, que representa el 26,0 % de la fracción carotenoidea, la persicaxantina y la criptoxantina con un 12,0 % cada uno de ellos y el β -caroteno y el fitoeno con un 10,0 % cada uno.

Los carotenoides son relativamente resistentes al calor y a pH extremos, pero por el contrario, son muy sensibles a la oxidación, reacción catalizada por la luz, lipoxidasas y peróxidos lipídicos. Los carotenoides tienen mucha importancia no sólo por el color que confieren a los alimentos, sino porque son los precursores más importantes de la vitamina A en el hombre. En general, son más abundantes en la piel de las frutas que en la porción carnosa.

3.3.5 Pectinas y sólidos en suspensión

En los cremogenados de fruta los sólidos en suspensión constituyen la pulpa, que está formada, principalmente, por tejido desintegrado, que contiene fibra celulósica, pectinas y

partículas lipoides que contienen carotenoides y aceites esenciales. Otra porción de pectinas se encuentra disuelta en el zumo y contribuye a la viscosidad y consistencia del mismo. La viscosidad depende de la concentración y del grado de polimerización de la pectina, así como del pH y de las sales existentes. La pectina total está formada por tres fracciones: la pectina soluble en agua (pectina de alto metoxilo), la pectina hidrolizada (pectina de bajo metoxilo) y la protopectina o pectina unida a la celulosa en forma insoluble (Primo, 1979).

Las pectinas que se encuentran presentes en la fruta, se encuentran también en los cremogenados o purés de fruta.

4 Reología en alimentos

4.1 Concepto y aplicaciones

La reología se define como la ciencia que estudia la deformación y flujo de la materia (Muller, 1973). La reología de los alimentos ha sido definida como "el estudio de la deformación y flujo de las materias primas sin procesar, los productos intermedios o semielaborados, y los productos finales de la industria alimentaria" (White, 1970).

El conocimiento adecuado de las propiedades reológicas de los alimentos es muy importante por numerosas razones, entre las que destacan las aplicaciones que se detallan a continuación:

- **Diseño de procesos y equipos en ingeniería:** el conocimiento de las propiedades de comportamiento al flujo y de deformación de los alimentos son imprescindibles en el diseño y dimensionado de equipos tales como cintas transportadoras, tuberías, tanques de almacenamiento, pulverizadores o bombas para el manejo de alimentos (Odigboh y Mohsenin, 1975a, Boger y Tiu, 1974; Gorbатов y Gorbатов, 1974). Además, la viscosidad se utiliza para la estimación y cálculo de los fenómenos de transporte de cantidad de movimiento, calor y energía (Jiménez *et al.*, 1987; Gekas, 1992; Saravacos y Kostaropoulos, 1995).

- **Evaluación sensorial:** los datos reológicos pueden ser muy interesantes para modificar el proceso de elaboración o la formulación de un producto final de forma que los parámetros de textura del alimento se encuentren dentro del rango considerado deseable por los consumidores (Shama y Sherman, 1973; Rao *et al.*, 1977 a, b; Kokini, 1985).

- **Obtener información sobre la estructura del alimento:** los estudios reológicos pueden aportarnos información que facilite una mejor comprensión de la estructura o de la distribución de los componentes moleculares de los alimentos, especialmente de los componentes macromoleculares, así como para predecir los cambios estructurales durante los procesos de acondicionamiento y elaboración a los que son sometidos (Borwankar *et al.*, 1992; Sherman, 1970).

- **Control de calidad:** las medidas de la viscosidad en continuo son cada vez más importantes en muchas industrias alimentarias con objeto de controlar el buen funcionamiento del proceso productivo, así como la calidad de las materias primas, productos intermedios y acabados. (Kramer y Twigg, 1970; Bourne, 1992).

4.2 Reología en fluidos alimentarios

Los alimentos se presentan en una gran variedad de formas, tales como sólidos, líquidos y semilíquidos. Algunos alimentos, entre los que se encuentran los helados y las grasas, son sólidos a una temperatura y líquidos a otra. Otros son suspensiones (mermeladas, zumos y purés o cremogenados de frutas, o emulsiones como la leche. Debido a esta amplia

variación en su estructura, el comportamiento al flujo de los alimentos fluidos presenta una amplia gama de modelos que van desde el simple newtoniano a los no newtonianos dependientes del tiempo y los viscoelásticos.

Los numerosos estudios reológicos realizados en alimentos que se encuentran en la bibliografía confirman la gran diversidad de comportamientos al flujo que pueden presentar. Todo ello hace necesario un análisis crítico de los fenómenos subrayados bajo una variedad de condiciones de flujo y establecer las relaciones entre la estructura y el comportamiento al flujo (Barbosa-Canovas *et al.*, 1993).

Cuando se trabaja con átomos o moléculas mono o diatómicas no polares, pequeñas y esféricas, se puede aplicar la teoría molecular de la viscosidad, la cual señala que los parámetros que contribuyen a la viscosidad son el volumen molecular, la masa molecular, la distancia entre moléculas, la distribución radial de las moléculas, y las fuerzas de atracción entre las moléculas (Bondi, 1956). Cuando las moléculas son más largas y más complejas, caso de los alimentos, se hace necesario tener en consideración toda una serie de parámetros adicionales, tales como factores geométricos e interacciones entre partículas.

El tamaño o volumen, la forma, la concentración y la interacción de las partículas son parámetros básicos que afectan a las propiedades reológicas de cualquier sistema, sea éste molecular, una suspensión, una dispersión, una pasta o un gel. Sin embargo, el rango de operación de cada uno de estos parámetros básicos es diferente para cada uno de los sistemas. De hecho, no son estos parámetros por sí mismos los que controlan las propiedades de flujo, sino las interacciones entre ellos (Rha, 1978).

El comportamiento reológico de un fluido alimentario puede describirse según distintas ecuaciones que relacionan el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación. En la literatura existen muchos modelos para describir este comportamiento, sin embargo son varios los autores (Kokini, 1992; Rha, 1978) que coinciden al afirmar que uno de los modelos más comúnmente usados y de aplicación general para ajustar los datos experimentales y expresar cuantitativamente el comportamiento al flujo de los fluidos inelásticos independientes del tiempo es el modelo propuesto por Herschel y Bulkley:

$$\tau = \tau_0 + K_H \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

donde:

τ = esfuerzo cortante

τ_0 = umbral de fluencia

K_H = índice de consistencia de flujo

$\dot{\gamma}$ = velocidad de deformación

n = índice de comportamiento al flujo

Esta ecuación puede representar, dependiendo de los valores que tomen las constantes, comportamientos newtonianos, plásticos de Bingham, pseudoplásticos y dilatantes. En la siguiente tabla se muestra el comportamiento al flujo y algunos ejemplos de varios tipos de alimentos fluidos y semifluidos.

Tipo de flujo	Índice de consistencia	Índice de comportamiento al flujo	Umbral de fluencia	Ejemplo
Newtoniano	Viscosidad $K > 0$	$n = 1$	$\tau_0 = 0$	Zumos clarificados, aceites, leche, jarabes de pastelería.
Seudoplástico	Viscosidad aparente $K > 0$	$0 < n < 1$	$\tau_0 = 0$	Zumos concentrados cremogenados y purés, de fruta, almidón.
Plástico de Bingham	Plasticidad constante $K > 0$	$n = 1$	$\tau_0 > 0$	Aderezos de ensalada, salsa de dulce de chocolate, ketchup.
Tipo mixto	Índice de consistencia $K > 0$	$0 < n < 1$	$\tau_0 > 0$	Mermelada, jalea.
Dilatante	Índice de consistencia $K > 0$	$1 < n < \infty$	$\tau_0 = 0$	Mantequilla de cacahuete, pasta de salchichas.

Características de flujo de alimentos líquidos.
(Fuente: Rha C. K. 1978).

5 Clasificación de los alimentos fluidos según su comportamiento reológico

Para una mayor comprensión de los problemas que se plantean en el estudio de las propiedades reológicas de los alimentos, se presenta a continuación una clasificación de los diversos alimentos fluidos más habituales según su comportamiento reológico.

La bibliografía es abundante en lo referente a la clasificación de los fluidos alimentarios (Holdsworth, 1971; Muller, 1973; Rao, 1977b; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1993). De modo general, la mayoría de los autores, coinciden al hacer una primera clasificación entre alimentos newtonianos y no newtonianos, según su comportamiento reológico siga o no la ley de Newton de la viscosidad. Además, existen alimentos en los que su comportamiento depende del tiempo de actuación del esfuerzo realizado sobre ellos. Finalmente, existe otro grupo de alimentos que se comportan como fluidos viscosos y sólidos elásticos a la vez, son los fluidos viscoelásticos.

Así, la clasificación de los fluidos alimentarios según su comportamiento reológico puede establecerse de la siguiente forma:

- Fluidos newtonianos.
- Fluidos no newtonianos.
 - Independientes del tiempo
 - Plásticos de Bingham
 - Seudoplásticos
 - Dilatantes
 - Dependientes del tiempo
 - Fluidos tixotrópicos
 - Fluidos reopéticos
- Fluidos viscoelásticos

5.1 Fluidos newtonianos

Los fluidos newtonianos son llamados así después de que Isaac Newton describiera el flujo viscoso. El fluido newtoniano no posee propiedades elásticas, es incompresible, isotrópico y carente de estructura y, como el sólido de Hooke, no existe en la realidad. Sin embargo, muchos líquidos reales muestran un comportamiento newtoniano en un amplio rango de esfuerzos cortantes. Estos líquidos son a los que los reólogos se refieren como "líquidos newtonianos" (Muller, 1973).

El comportamiento reológico de un fluido newtoniano se ilustra en la [Figura 1-2](#), en la que un fluido está contenido entre dos placas paralelas. La placa superior es obligada a moverse con una velocidad v , relativa con respecto a la placa inferior, esta fuerza es debida a la aplicación de una fuerza cortante F por unidad de área (se considera que los efectos de borde son despreciables) o lo que es lo mismo, un esfuerzo cortante o tensión de cizalladura, τ . Las capas del fluido en contacto con las placas se considera que se mueven a la misma velocidad que la superficie con la que están en contacto, lo que supone que no tiene lugar deslizamiento en las paredes. Entonces el fluido se comporta como una serie de capas paralelas, o láminas, cuyas velocidades son proporcionales a su distancia a la placa inferior.

Así, el comportamiento reológico de los fluidos ideales o newtonianos puede describirse mediante la ley de Newton de la viscosidad, que viene expresada por la ecuación:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (2)$$

que indica que cuando un fluido es sometido a un esfuerzo cortante, τ , existe una proporcionalidad directa entre la velocidad de deformación o gradiente de velocidad, $\dot{\gamma}$, que sufre el fluido y dicho esfuerzo cortante. Esta constante de proporcionalidad, η , es el llamado coeficiente de viscosidad, viscosidad dinámica o simplemente viscosidad (Charm, 1960).

En este tipo de fluidos la viscosidad sólo depende de la temperatura y composición, siendo independiente del tiempo, de la velocidad de deformación y de la historia previa del fluido (Rao, 1977b).

Un número limitado de alimentos muestran características de flujo ideal, entre los que se encuentran algunos tan importantes fisiológicamente como el agua, nutritivamente como la leche y económicamente como las bebidas refrescantes.

Son muchos los autores que, como resultado de sus investigaciones, atribuyen un comportamiento casi newtoniano a gran número de alimentos fluidos. Como ejemplo de los más nombrados se pueden citar el agua y las disoluciones diluidas de azúcares (Perry y Chilton, 1982); las bebidas carbónicas, las bebidas alcohólicas (si no contienen moléculas de cadena larga), los extractos de carne; el jarabe de maíz (Rao, 1975) y ciertas mieles (Rao, 1977 a); algunos aceites ligeros de cocina y la leche cruda y homogeneizada (Steffe *et al.*, 1986), el huevo y algunos de sus derivados (Scalzo *et al.*, 1970). En la bibliografía, son también muy numerosas las citas que consideran el comportamiento newtoniano de los zumos clarificados y despectinizados de diversas frutas en un rango amplio de temperaturas y concentraciones de sólidos solubles (Saravacos, 1970; Rao *et al.*, 1984; Schwartz y Costell, 1989; Ibarz *et al.*, 1992; Khalil *et al.*, 1989).

5.2 Fluidos no newtonianos

Son aquellos fluidos que no cumplen la ley de Newton de la viscosidad, por lo tanto, la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación deja de ser lineal.

Estos fluidos se caracterizan porque su viscosidad no permanece constante cuando la

temperatura y la composición permanecen invariables, sino que depende del esfuerzo cortante o gradiente de velocidad $\dot{\gamma}$, a veces, del tiempo de aplicación del esfuerzo y de la historia previa del producto o muestra. Ello es debido a que la constitución física varía al someter el producto a los efectos de rozamiento a lo largo del tiempo. Dado que en este tipo de fluidos la viscosidad no permanece constante, se define la viscosidad aparente, η_a , (Jiménez *et al.*, 1987) como la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación correspondiente:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \neq \text{cte} \quad (3)$$

5.2.1 Fluidos independientes del tiempo

Los fluidos independientes del tiempo se han clasificado en tres categorías o grupos: plásticos, pseudoplásticos y dilatantes, y se caracterizan por que la viscosidad aparente sólo depende de la temperatura, de la composición del fluido y del esfuerzo cortante o gradiente de velocidad aplicado, pero nunca del tiempo de aplicación de éste último.

En la [Figura 1-3](#) se representan las curvas de fluidez y de viscosidad de algunos de los comportamientos reológicos más frecuentes.

5.2.1.1 Fluidos plásticos

Los fluidos plásticos son aquellos que no fluyen hasta que son sometidos a un esfuerzo cortante límite determinado, llamado esfuerzo de deformación plástica, umbral de fluencia o límite de fluencia, τ_0 . En el caso de los fluidos plásticos de Bingham, una vez que se supera el valor del umbral de fluencia, la velocidad de deformación es proporcional al esfuerzo, como en el caso de los fluidos newtonianos (van Wazer *et al.*, 1963). Estos fluidos exhiben propiedades de líquido a esfuerzos superiores al umbral de fluencia por lo tanto pueden ser clasificados tanto como líquidos como sólidos.

El producto plástico ideal es el descrito por el modelo de Bingham:

$$\tau = \tau_0 + \eta' \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

donde τ_0 es el umbral de fluencia y η' es la viscosidad plástica.

Según Rha (1978), el umbral de fluencia puede ser consecuencia de un entrelazado de moléculas o partículas debido a su gran tamaño, ramificaciones o forma irregular. También puede ser debida a la formación de redes provocadas por las interacciones entre moléculas o partículas.

Entre los alimentos típicamente plásticos se encuentran el puré de patata y la nata batida, el chocolate fundido y algunas grasas como margarinas y mantequillas (Muller, 1973). El modelo de Bingham ha sido también utilizado por algunos autores para describir el comportamiento reológico de pastas de fécula de mandioca (Odigboh y Mohsenin, 1975b), suero de puré de albaricoque a gradientes de deformación bajos (Costell *et al.*, 1982), de geles de pectina (Fizman *et al.*, 1984) y de algunos zumos naturales de manzana (Ibarz y Casero, 1987).

5.2.1.2 Fluidos pseudoplásticos

Los fluidos pseudoplásticos se caracterizan porque su viscosidad aparente decrece cuando aumenta el gradiente de velocidad de deformación. Este comportamiento indica una ruptura o reorganización continua de la estructura, dando como resultado una menor resistencia al flujo, y es debido a la presencia de sustancias de alto peso molecular así como a la dispersión de sólidos en la fase sólida.

De los modelos utilizados para describir el comportamiento reológico de los fluidos pseudoplásticos, el más conocido y simple de aplicar es el de Ostwald-De Waale, también conocido como ley de la potencia (Sherman, 1970):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

donde K es el índice de consistencia de flujo y n es el índice de comportamiento al flujo. K da una idea de la consistencia del producto y n de la desviación del comportamiento al flujo respecto al newtoniano (Carbonell *et al.*, 1990). Esta ecuación es una de las más utilizadas para describir el flujo de los derivados de fruta que se comportan como pseudoplásticos.

Otra relación muy utilizada es la propuesta por Herschel y Bulkley (Ecuación 1), cuya expresión supone ampliar la ley de la potencia con un término correspondiente al umbral de fluencia (Sherman, 1970).

Otro modelo muy utilizado es el de Casson (Scott Blair, 1966), que viene definido por la ecuación:

$$\tau^{0.5} = K_{0C} + K_C \dot{\gamma}^{0.5} \quad (6)$$

Además de estos modelos existen otros muchos, pero los más utilizados en el caso de fluidos alimentarios pseudoplásticos son los anteriormente descritos.

El comportamiento pseudoplástico es, quizás, el más frecuente en los fluidos alimentarios. En general, se comportan de esta forma muchos derivados de frutas y vegetales como algunos zumos y purés de frutas (Saravacos, 1970), derivados del tomate (Tanglertpaibul y Rao, 1987), confituras de fruta (Costell *et al.*, 1986); productos lácteos como la nata (Prentice, 1984) o la leche azucarada condensada (Higgs y Norrington, 1971); algunas sopas y salsas (Wood, 1968); la clara de huevo (Tung *et al.*, 1970); la yema del huevo (Ibarz y Sintés, 1989; Ibarz, 1993); el ketchup y la mostaza francesa (Higgs y Norrington, 1971).

5.2.1.3 Fluidos dilatantes

La principal característica de este tipo de fluidos es que al aumentar la velocidad de deformación aumenta la viscosidad aparente.

La dilatancia puede explicarse entendiendo que cuando las velocidades de deformación son bajas las partículas sólidas de formas y tamaños variados, están ceñidas y estrechamente empaquetadas y la fracción líquida está llenando los huecos y lubricando el movimiento, por lo que la viscosidad aparente es baja. Con el aumento de la velocidad de deformación, las partículas largas y flexibles pueden estirarse rompiéndose el empaquetamiento de los sólidos y la fracción de huecos entre las partículas aumenta, no habiendo suficiente líquido para lubricar el roce de unas partículas contra otras, aumentando por ello la viscosidad aparente.

La dilatancia es evidencia de una formación o reorganización de la estructura de la

muestra, dando como resultado un aumento en la resistencia al aplicar una fuerza (Rha, 1978).

Los modelos reológicos que se utilizan para describir este comportamiento son los mismos que los aplicados para describir el comportamiento pseudoplástico, que se ha expuesto en el apartado anterior.

Existen pocos alimentos que presenten esta característica, entre ellos tenemos aquellos que forman suspensiones concentradas o pastas acuosas. Algunos ejemplos son ciertos tipos de mieles de eucalipto (Pryce-Jones, 1953).

5.2.2 Fluidos no newtonianos dependientes del tiempo

Son aquellos fluidos en los que la viscosidad aparente depende, además de la velocidad de deformación, del tiempo de actuación de dicha velocidad.

Los alimentos no newtonianos con propiedades dependientes del tiempo se subdividen en fluidos tixotrópicos y reopéticos. Para los primeros, a una velocidad de deformación fija, la viscosidad disminuye con el tiempo de cizallado; para los últimos, la viscosidad aumenta con el tiempo (Rao, 1977 b; Barbosa-Cánovas, *et al.*, 1993).

5.2.2.1 Fluidos tixotrópicos

Se consideran fluidos tixotrópicos a todos aquellos que al aplicarles una velocidad de deformación constante, muestran una disminución del esfuerzo cortante y de la viscosidad aparente con el tiempo. Esto es debido al cambio continuo de la estructura del material, que puede ser en cualquier caso reversible o irreversible. La tixotropía indica una continua ruptura o reorganización de la estructura dando como resultado una disminución de la resistencia al flujo (Rha, 1978).

Todas las definiciones de tixotropía incluyen el concepto de recuperación estructural. Sin embargo, muchos alimentos tienen un comportamiento al flujo dependiente del tiempo pero su periodo de recuperación es muy largo o su estructura sólo es parcialmente recuperable. Por ello es más adecuado utilizar los términos "dependencia del tiempo en el flujo" o "destrucción estructural" para definir este tipo de comportamiento (Gallegos *et al.*, 1988).

Se han utilizado distintos modelos matemáticos para cuantificar la dependencia del tiempo de los alimentos. A continuación se describen los más importantes.

- Modelo de WELTMANN (1943)

La expresión matemática propuesta por Weltmann

$$\tau = \tau_0 - \log t \quad (7)$$

relaciona la viscosidad plástica con el tiempo de aplicación de un determinado gradiente de velocidad a través del coeficiente temporal de ruptura tixotrópica (B), el cual representa, en cierta manera, la cantidad de estructura que se degrada durante el cizallamiento. El parámetro τ_0 indica la tensión tangencial necesaria para que comience a degradarse la estructura que origina la tixotropía.

Una modificación de esta ecuación ha sido utilizado por varios autores para analizar la dependencia del tiempo al flujo de varios alimentos, como la clara de huevo (Tung *et al.*, 1970), el zumo de tomate (Jiménez *et al.*, 1988), los aderezos de ensalada (Paredes *et al.*, 1988) y el puré de albaricoque (Costell y Duran, 1978).

$$\tau = \tau_0 - B \ln t \quad (8)$$

- Modelo de HAHN *et al.* (1959)

$$\log(\tau - \tau_e) = \tau_0 - B_1 t \quad (9)$$

donde τ_0 , al igual que en el modelo de Weltmann, indica el esfuerzo cortante inicial necesario para que comience a degradarse la estructura que da lugar a la tixotropía. El valor de B_1 informa sobre la velocidad del proceso de degradación de la estructura y depende de la resistencia estructural del fluido frente al cizallamiento que se aplica. τ es el esfuerzo cortante y τ_e es el esfuerzo cortante de equilibrio.

- Modelo de TIU y BOGER (1974)

Este modelo permite caracterizar de forma completa el comportamiento reológico de materiales cuyo comportamiento se podría definir como plástico, pseudoplástico y dependiente del tiempo (Carbonell *et al.*, 1990):

$$\tau = k(\tau_0 + K_H \dot{\gamma}^n) \quad (10)$$

este modelo asume que el parámetro estructural k varía con el tiempo según una ecuación cinética de segundo orden, válida para $k > k_e$:

$$\frac{dk}{dt} = K_t(k - k_e)^2 \quad (11)$$

en la que la constante K_t es una constante de velocidad que es función de la velocidad de deformación y debe ser determinada experimentalmente.

- Modelo de FIGONI y SHOEMAKER (1983)

Este modelo supone que la disminución del esfuerzo cortante es una suma de funciones cinéticas de primer orden:

$$\tau - \tau_e = \sum_i (\tau_{0i} - \tau_{ei}) \exp(-K_i t) \quad (12)$$

donde τ_e es el esfuerzo cortante del equilibrio, τ_0 es el esfuerzo cortante correspondiente al tiempo inicial y K_i las constantes cinéticas de degradación de la estructura.

El comportamiento tixotrópico ha sido encontrado en varios alimentos. Además de la clara de huevo, el zumo de tomate, los aderezos de ensalada y el puré de albaricoque, citados anteriormente, también se ha observado este comportamiento en leche condensada, mayonesa (Xu *et al.*, 1984; Ford y Steffe, 1986; Gallegos *et al.*, 1988), algunos quesos blandos (Massaguer-Roig *et al.*, 1984) y miel. Entre otras muchas investigaciones realizadas en alimentos cabe, también, destacar las que llevaron a cabo Kokini y Dickie (1981), quienes observaron dependencia con el tiempo cuando estudiaron el comportamiento reológico de muestras de mayonesa, mantequilla, margarina, puré de manzana, ketchup y mostaza.

5.2.2.2 Fluidos reopépticos

Los fluidos reopépticos tienen un comportamiento al flujo contrario a los tixotrópicos, es decir, la viscosidad aparente aumenta con el tiempo en que la muestra es sometida a un determinado gradiente de velocidad, lo que les confiere una cierta semejanza con los fluidos

dilatantes en el sentido de que la única diferencia es si el tiempo para la destrucción o formación de estructura es detectable o no.

El modelo reológico aplicable a estos fluidos es el de la ley de la potencia, siendo el valor del índice de comportamiento al flujo mayor que la unidad. Al igual que con los otros tipos de fluidos, para este tipo de alimentos se pueden aplicar otros modelos distintos con mayor o menor éxito.

Finalmente indicar que, aunque se ha observado un comportamiento reopéptico en algunos alimentos como ciertas mieles de eucalipto, este tipo de fluidos son muy poco frecuentes en el campo de la alimentación.

5.2.3 Fluidos no newtonianos viscoelásticos

Las características de los productos viscoelásticos varían desde las de los líquidos viscosos con propiedades elásticas (modelo de Maxwell) a las de los sólidos con propiedades viscosas (modelo de Kelvin-Voigt). En condiciones normales, no es apreciable la elasticidad debida al estiramiento de los enlaces interatómicos y se puede afirmar que la elasticidad de los alimentos viscoelásticos es debida a la deformación elástica de las macromoléculas. En los alimentos viscoelásticos es frecuente que sólo se dé una recuperación parcial, porque la red tridimensional elástica se desintegra bajo el efecto de la tensión (Muller, 1973).

Una forma de caracterizar estos fluidos es estudiando la evolución del esfuerzo cortante con el tiempo a una velocidad de deformación fija pudiéndose realizar un análisis comparativo de las diferentes muestras a partir de las curvas obtenidas (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1993).

Existen diversos modelos matemáticos que permiten explicar el comportamiento de los fluidos viscoelásticos. El más simple de todos ellos puede obtenerse combinando un sólido de Hooke con un fluido de Newton, lo que lleva al conocido modelo de Maxwell

$$\tau + \lambda \dot{\tau} = \eta \dot{\gamma} \quad (13)$$

donde λ es el tiempo de relajación definido como la relación entre la viscosidad newtoniana (η) y el módulo de elasticidad (G).

Este modelo resulta ser excesivamente simple, por lo que tiene el defecto de ser demasiado restringido ya que solamente puede ser aplicado cuando el comportamiento viscoelástico es lineal y, por lo tanto, no es adecuado cuando lo que se pretende representar es un comportamiento no lineal como el observado en los materiales reales. Es por esto, que son necesarias expresiones más complicadas que modelicen de forma más apropiada los comportamientos viscoelásticos no lineales (Kokini, 1992). El modelo de Bird-Carreau es uno de ellos, y está basado en la teoría constitutiva de Carreau que incorpora la historia completa de deformación del material.

Existen varios alimentos que presentan propiedades viscoelásticas. Se trata, en general, de productos con características de geles o semisólidos como los geles de almidón-gelatina y los de leche, los helados, las manzanas, los fideos cocidos, el queso, la masa de harina de trigo, las espumas de proteína y los granos de maíz y trigo (Muller, 1973). También presentan propiedades viscoelásticas la crema de leche y la mantequilla batida (Rao, 1986).

6 Factores que influyen en el comportamiento reológico

Existen muchos factores que influyen en el comportamiento reológico de los alimentos como son la presión, la estructura del alimento, el gradiente de velocidad o

velocidad de deformación y el tiempo de tratamiento de la muestra. Pero son, quizás, la temperatura de tratamiento y la concentración del alimento los más importantes y los que más se han estudiado.

6.1 Efecto de la temperatura

Hasta el momento en que son consumidos, los alimentos están sometidos continuamente a cambios de temperatura. Empezando por el proceso de elaboración y pasando por los periodos de transporte y almacenamiento las condiciones de temperatura a que son sometidos los alimentos pueden variar notablemente. Por este motivo es muy importante conocer sus propiedades reológicas en función de la temperatura.

Son muchos los autores que en sus investigaciones correlacionan el efecto que la temperatura ejerce sobre la viscosidad mediante una ecuación de tipo Arrhenius (Vitali y Rao, 1982; Cryall *et al.*, 1982; Rao *et al.*, 1984; Manohar *et al.*, 1991; Ibarz *et al.*, 1992).

Para los fluidos newtonianos, la expresión que correlaciona la viscosidad con la temperatura es:

$$\eta = K_0 \exp (E_a / RT) \quad (14)$$

donde K_0 es el factor de frecuencia, E_a es la energía de activación de flujo, R es la constante universal de los gases perfectos y T es la temperatura absoluta.

En el caso de los fluidos no newtonianos en lugar de la viscosidad se correlaciona la viscosidad aparente a una velocidad de deformación fijada (Vitali, *et al.*, 1974; Rao *et al.*, 1984; Moresi y Spinosi, 1984):

$$\eta_a = \eta^\infty \exp (E_a / RT) \quad (15)$$

siendo η_a la viscosidad aparente y η una constante denominada viscosidad de deformación infinita.

En el caso de fluidos que obedecen el modelo de la ley de la potencia y de Herschel-Bulkley, el efecto de la temperatura puede correlacionarse mediante un modelo combinado de la ecuación de Arrhenius para el índice de consistencia (Harper y El-Sahrigi, 1965; Vitali y Rao, 1984):

$$\tau = K \exp (E_a / RT) \dot{\gamma}^n \quad (16)$$

Esta ecuación ha sido utilizada en concentrados de tomate (Harper El-Sahrigi, 1965; Rao *et al.*, 1981), cremogenado de pera (Harper y Lebermann, 1962), puré de guayaba (Vitali y Rao, 1982) y concentrados de frambuesa (Ibarz y Pagán, 1987).

En líneas generales puede decirse que la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura, y lo mismo ocurre con el índice de consistencia y el umbral de fluencia. Ibarz *et al.*, (1995), al estudiar el comportamiento reológico de zumos concentrados de kiwi (55,7 y 63 °Brix), establecen una relación de tipo lineal entre el índice de consistencia y la temperatura, que se concreta en la siguiente expresión:

$$\tau_0 = a - bT \quad (17)$$

donde τ_0 es el umbral de fluencia, a y b son constantes y T es la temperatura en Kelvin.

La variación de la temperatura no suele afectar al índice de comportamiento al flujo

(Sáenz y Costell, 1986) aunque algunos autores afirman que aumenta con la temperatura (Ibarz y Pagán, 1987).

6.2 Efecto de la concentración

Se han descrito dos tipos de correlaciones o modelos matemáticos para considerar el efecto de la concentración en la viscosidad (Harper y El-Sahrigi, 1965; Saravacos, 1970; Rao *et al.*, 1984), una según un modelo potencial:

$$\eta = K_1 C^{A_1} \quad (18)$$

y otra según un modelo exponencial:

$$\eta = K_2 \exp(A_2 C) \quad (19)$$

En estas ecuaciones K_1 , K_2 , A_1 y A_2 son constantes y C es el contenido en sólidos solubles del fluido expresado en °Brix. Estas ecuaciones también son válidas para estudiar el efecto de la concentración en el índice de consistencia.

El modelo potencial da resultados satisfactorios en purés de frutas y hortalizas altamente viscosos (Rao *et al.*, 1981; Vitali y Rao, 1982). Sin embargo, los mismos autores encontraron que para zumos de fruta concentrados el modelo exponencial proporcionaba mejores ajustes. Esto último ha sido confirmado por otros autores que han estudiado la reología de zumos clarificados de diversas frutas (Ibarz *et al.*, 1989; Ibarz y Ortiz, 1993; Schwartz y Costell, 1989).

Normalmente, un aumento de la concentración comporta un incremento de la viscosidad o del índice de consistencia. También puede afectar a otros parámetros como el umbral de fluencia, que si bien tiende a aumentar con la concentración a veces se ha descrito el efecto contrario (Ibarz *et al.*, 1991). Por lo que respecta al índice de comportamiento al flujo, un aumento de la concentración o bien no le afecta (Sáenz y Costell, 1986) o bien hace que disminuya (Mizrahi y Berk, 1972).

7 Medidas en reología

Basándose en la clasificación de los instrumentos para el estudio de la textura hecha por Scott-Blair (1958), Rao (1986) clasificó los instrumentos para el estudio de las propiedades de flujo de los alimentos en tres categorías según métodos en los que se utilizan:

- **Métodos fundamentales:** Miden propiedades físicas bien definidas utilizando geometrías que son fáciles de analizar matemáticamente. Este punto se desarrolla en el siguiente apartado.

- **Métodos empíricos:** Miden parámetros que no están claramente definidos, pero que la experiencia ha demostrado que son útiles. Algunos instrumentos como los consistómetros Adams y Bostwick, y el viscosímetro de flujo de tubo, han sido utilizados para caracterizar cremogenados de frutas y vegetales, papillas infantiles (*baby foods*), y alimentos de tipo puré. Los métodos empíricos se usan en el control de calidad de estos productos y en estudios relacionados con los efectos de los cambios de las condiciones de procesado en la consistencia de los purés (Rao, 1986).

También se incluirían en este grupo los viscosímetros rotacionales que utilizan geometrías de difícil análisis matemático, como husos con agujas o aletas, con las cuales se obtiene, para fluidos no newtonianos, una magnitud de viscosidad aparente en unidades

arbitrarias.

- **Métodos imitativos:** estos aparatos miden las propiedades en condiciones que simulan las que se dan en la práctica. Estos aparatos son utilizados principalmente en alimentos sólidos.

7.1 Métodos fundamentales

Varios instrumentos se han empleado para medir las propiedades de flujo mediante métodos fundamentales. Éstos pueden ser clasificados en función de la geometría específica empleada: capilar, cilindros concéntricos, plato y cono y platos paralelos.

Para todas la geometrías se deben cumplir tres requisitos: que el fluido tenga flujo laminar, que la operación sea isoterma y que no exista deslizamiento en la interfase sólido-fluido.

Viscosímetros capilares

Se basa en el hecho de que cuando un fluido fluye a través de un tubo forma un gradiente de velocidad y se induce un cizallamiento. El fluido puede fluir por acción de la gravedad o por efecto de un presión dada. Si se conocen el caudal volumétrico, las dimensiones del tubo y la presión aplicada se pueden construir las curvas de fluidez y calcular los valores aparentes de la viscosidad (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1993).

Estos aparatos han sido utilizados por algunos autores para estudiar las propiedades reológicas de algunos zumos y purés de fruta (Saravacos, 1968; Rao *et al.*, 1974; Vitali y Rao, 1982).

Viscosímetros Plato-Cono y Plato-Plato

Es un tipo de viscosímetro rotacional que consta que un plato circular plano y de un cono (plato-cono) u otro plato plano (plato-plato o platos paralelos). El ángulo del cono es de 3° o menor para evitar distorsiones en los resultados debido al efecto borde. Las ecuaciones que permiten calcular la velocidad de deformación y el esfuerzo cortante han sido deducidas por Brodkey (1967) para el caso de plato-cono y por Walters (1975) para platos paralelos.

Viscosímetro de cilindros concéntricos

Consta de un vaso de medición cilíndrico (de radio R_a) que contiene en su interior un cilindro (de radio R_i) de forma que el fluido queda atrapado en la corona anular que dejan el vaso y el cilindro interior. Durante la operación de medida, el cilindro interior o el vaso giran a una velocidad constante, mientras el otro permanece fijo. En estas condiciones el par transmitido por el elemento móvil hacia el fijo, a través del fluido, será constante.

Para poder obtener las ecuaciones fundamentales con este tipo de viscosímetros, además de los requisitos mencionados anteriormente, deben hacerse una serie de suposiciones adicionales (Rao, 1986):

- El flujo es estacionario.
- No existen componentes radiales ni axiales de la velocidad.
- No existe distorsión del campo de flujo por el efecto borde de los cilindros.

Si es el vaso de medición el que gira, permaneciendo el cilindro interior fijo, se denomina sistema Couette, mientras que si es al revés, es decir, el cilindro interior gira y el vaso permanece fijo se denomina sistema Searle. La transición de flujo laminar a turbulento ocurre a velocidades de giro más elevadas en el sistema Couette que en el Searle.

Si la corona anular es estrecha se imposibilita el estudio de alimentos que contienen partículas sólidas grandes como es el caso de los purés y pulpas de fruta (Rao, 1975).

8 Principales mecanismos de deterioro en zumos y cremogenados

Las principales alteraciones o modificaciones indeseables que se producen en zumos y derivados de fruta afectan a cambios en la textura, como ablandamientos, insolubilizaciones o pérdidas de capacidad de retención de agua; en el sabor, con desarrollo de sabores a acaramelado, rancidez u otros sabores extraños; en el color, por oscurecimientos o decoloraciones; y en el valor nutritivo por pérdida o degradación de vitaminas, proteínas y minerales (Tannenbaum, 1982).

Las principales causas de estas alteraciones son debidas a los microorganismos y a las reacciones químicas y bioquímicas. Los distintos procesos bioquímicos son catalizados por un gran número de enzimas, los cuales deben ser inactivados para que el alimento no pierda sus propiedades organolépticas originales. Sin embargo, se pueden dar casos en los que la actividad bioquímica quede inactiva pero que la acción microbiana persista y provoque alteraciones posteriores (Holdsworth, 1987).

En el aspecto microbiano las principales alteraciones que tienen lugar en derivados de fruta son las debidas a fermentaciones que son causadas en su mayoría por levaduras, aunque también algunas bacterias y mohos pueden originar modificaciones no deseadas en estos productos.

Dentro de las alteraciones químicas o bioquímicas en alimentos, hay numerosos mecanismos o reacciones capaces de ocasionar estas alteraciones, pero en los derivados de frutas, son quizás, las de pardeamiento no enzimático las que más importancia tienen a este respecto. Estas reacciones producen modificaciones en el color durante el proceso de extracción y elaboración, pero también pueden producirse durante la conservación y almacenamiento de los zumos y cremogenados (Mariné, 1982). Esta evolución del color se produce principalmente por reacciones de caramelización, debidas a la degradación del ácido ascórbico, y por reacciones de Maillard, un complejo grupo de reacciones que dan como resultado la formación de compuestos pardos denominados melanoidinas.

Para seguir la evolución del color provocada por el pardeamiento no enzimático en zumos y cremogenados de frutas se han ensayado diversos métodos, pero dada la complejidad de estas reacciones, es difícil establecer un mecanismo de reacción preciso que las describa en su globalidad. En consecuencia, las metodologías utilizadas abordan su estudio desde distintos enfoques (evolución del color, formación o degradación de compuestos) intentando describir la fenomenología observada mediante el seguimiento de distintos parámetros modelizables en expresiones matemáticas sencillas y de fácil determinación como son la absorbancia (Beveridge *et al.*, 1986; Lozano, 1991; Ibarz y Navés, 1995), la luminosidad y diferencia de color (Lozano *et al.*, 1994), e incluso se han definido nuevos índices que explique estas modificaciones del color (Buera *et al.*, 1985). Pero es, quizás, el contenido en HMF el índice más ampliamente utilizado en el estudio de los pardeamientos no enzimáticos en zumos y cremogenados, y es considerado como una medida de la intensidad del tratamiento térmico al que han sido sometidos los zumos (Aleixandre y Serrano, 1989; Toribio y Lozano, 1987; Ibarz *et al.*, 1989a; 1989b; Ibarz *et al.*, 1993), el cual se origina por distintas vías, una de ellas es la deshidratación de las hexosas en medio ácido y otra a través de las reacciones de Maillard (Feather, 1982; Hosney, 1984).

9 Microflora aislada en derivados de fruta

Todos los vegetales poseen en su superficie una microflora, más o menos característica, que depende mucho del tipo de planta, clima, ubicación, fase de desarrollo y en las frutas, sobre todo, del grado de maduración. La flora superficial tiene un gran interés

durante el almacenamiento y procesado de las frutas (Muller, 1981). Estudios acerca de la carga microbiana inicial en frutas y hortalizas realizados en la época de recolección demostraron que los recuentos promedios de levaduras estaban comprendidos entre más de 10^3 y $6,710^4$ pfc/g (o cm^2) de tejido (Webb y Mundt, 1978). Aunque en la mayor parte de los casos la contaminación es externa, también se han aislado microorganismos del interior (huesos y pepitas) de los frutos.

La materia prima utilizada en la elaboración de zumos y cremogenados de frutas contiene muchos géneros y especies de microorganismos, incluidos bacterias, mohos y levaduras (ICMSF, 1985), sin embargo, de acuerdo con su composición química, los zumos, cremogenados y pulpas de fruta, poseen una serie de especies microbianas para las que presentan buenas condiciones de crecimiento y desarrollo, mientras que para otras constituyen un mal sustrato. Además de las condiciones nutritivas, el pH juega un papel primordial como factor seleccionador y como retardante o inhibidor del crecimiento microbiano (Muller, 1981).

De las frutas frescas y sus zumos se han aislado numerosos géneros de bacterias (Ingram y Luthi, 1961; Sand, 1973). Las principales especies pertenecen a los grupos de las bacterias lácticas (géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*), acéticas (géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*) y algunas bacterias esporuladas del género *Bacillus*. Turtura *et al.* (1988) al estudiar la microflora bacteriana presente en zumos y néctares de frutas observó que las cepas aisladas pertenecían a los géneros *Lactobacillus*, *Gluconobacter* y *Bacillus* con una distribución del 55,42 %, 10,28 % y 34,28 % respectivamente.

Las especies de levaduras que se pueden encontrar en los derivados de frutas dependen del tipo de fruta (Baird y Kooiman, 1985). A continuación se relacionan algunas de las levaduras más frecuentes en los distintos tipos de frutas y sus derivados más importantes:

- Las manzanas enteras y sus zumos recién exprimidos contienen fundamentalmente levaduras asporógenas como especies de *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces* y *Cryptococcus*.

- Los jugos de manzana fermentados contienen principalmente levaduras esporógenas de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces* y *Saccharomycopsis*.

- Las uvas y los zumos de uva se encuentran contaminados principalmente por levaduras esporógenas como *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota*, y *Debaryomyces*. También se encuentran presentes especies asporógenas como *Kloeckera apiculata* que junto con *Saccharomyces cerevisiae* comprenden alrededor del 80 % de las levaduras totales en uvas y otra frutas.

- Los jugos de cítricos se contaminan fundamentalmente con *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces* y *Pichia*.

- En conservas de frutos tropicales se han aislado levaduras de los géneros *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Bhajekar y Kulkarni, 1991).

En general, las especies que han sido aisladas con mayor frecuencia de frutas y sus derivados han sido *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida tropicalis* (Torok y King, 1991a).

10 Microflora alterante de los derivados de fruta

Los zumos, cremogenados y derivados de fruta en general constituyen ecosistemas relativamente únicos, dada la particular combinación de sus propiedades físicas y químicas, dentro de las cuales destacan, además del pH y la acidez, la actividad de agua y la presencia de sustancias antimicrobianas naturales como aceites esenciales, ácido benzoico o ácido sórbico (Baird y Kooiman, 1985).

Aunque algunos zumos podrían llegar a constituir un buen medio de cultivo para

algunas bacterias acidolácticas, como *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, la mayor parte de las bacterias son incapaces de crecer a los niveles de pH que presentan los derivados de frutas (Cardona *et al.*, 1992), ya que prefieren un pH neutro para su desarrollo. Contrariamente, las levaduras y mohos pueden crecer y desarrollarse en estas condiciones, de ahí que la mayor parte de las alteraciones microbianas que tienen lugar en zumos y derivados de frutas sean debidas a las levaduras, más del 90 % según Cardona *et al.* (1992), y buena parte del resto a mohos.

En cuanto a la presencia de patógenos en los productos a base de frutas, es preciso decir que son productos de bajo riesgo sanitario debido fundamentalmente a que el bajo valor de su pH limita el crecimiento de este tipo de microorganismos.

10.1 Alteraciones bacterianas

Las bacterias responsables del deterioro de los alimentos ácidos (pH < 4,5) son todas gram-positivas (Corlett y Brown, 1983). Entre las bacterias causantes de alteración en zumos y cremogenados, sólo las lácticas y las acéticas merecen ser consideradas, ya que, como ya se ha señalado anteriormente, debido a las condiciones de pH y acidez que presentan estos productos, rara vez son capaces de desarrollarse otras especies bacterianas.

Las bacterias productoras de ácido láctico figuran entre las más alterantes de zumos de fruta, siendo las especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* las que más frecuentemente han sido aisladas de zumos alterados. Entre los lactobacilos aislados predominan los heterofermentativos, es decir que, además de ácidos orgánicos, producen alcohol etílico y CO₂ a partir del azúcar. El crecimiento de este tipo de bacterias en productos derivados de frutas se ve favorecido por su capacidad para desarrollarse en condiciones de anaerobiosis, por su tolerancia a la acidez (algunas especies pueden crecer a un pH de 3,0-3,5 y la mayoría pueden hacerlo a pH de 3,5) y por su capacidad de crecer a las temperaturas que se utilizan en el almacenamiento de zumos y cremogenados.

Las especies de *Gluconobacter* también pueden ser causantes de alteraciones, dada su capacidad para crecer a pH relativamente bajos, pero estos microorganismos son estrictamente aerobios por lo que sólo se multiplicaran adecuadamente cuando esté asegurado un buen aporte de oxígeno. Los productos alterados por este tipo de bacterias son ricos en ácido láctico, acético o glucónico, presentando generalmente un aspecto turbio y, algunas veces, burbujas de gas visibles.

Las bacterias alterantes son relativamente sensibles al tratamiento térmico y son destruidas por las técnicas corrientes de pasteurización. Por el contrario, las formas esporuladas son muy termorresistentes, aunque la germinación de las esporas se ve inhibida por los valores de pH bajos.

10.2 Alteraciones causadas por mohos

Los mohos son, generalmente, muy tolerantes a condiciones de acidez elevada, y son capaces de crecer con una reducida actividad acuosa, pero esta capacidad varía enormemente entre los géneros e incluso entre las distintas especies de un mismo género. Son capaces de crecer en condiciones nutritivas difíciles, pero estos microorganismos, con muy pocas excepciones, son estrictamente aerobios, por lo que su desarrollo se encuentra muy limitado en las condiciones de bajo contenido de oxígeno que presentan la mayoría de los derivados de fruta (Baird y Kooiman, 1985).

Los principales géneros que producen alteraciones en zumos y derivados de frutas son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Byssoschlamys*. Dragoni y Comi (1985) aislaron

cuatro especies de mohos a partir de zumos de fruta industriales: *Penicillium expansum*, *Byssoschlamys fulva*, *Byssoschlamys nivea*, y *Aspergillus fumigatus*, este último fue aislado en zumo de melocotón. Turtura *et al.* (1988) aislaron también diversas especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Trichoderma* cuando estudiaron la microbiología de bebidas no alcohólicas.

Este tipo de mohos cuando se desarrollan lo hacen, por su condición de aerobios, en la superficie formando colonias y micelios flotantes en el producto. A veces también son los causantes de la formación de flóculos o de una clarificación de la turbidez debido a la degradación de las pectinas. El crecimiento de mohos puede originar alteraciones en el color de los productos alterados como consecuencia de la difusión de sus pigmentos y de la destrucción de los pigmentos naturales de las frutas. Muchos mohos destruyen los ácidos de la fruta como el cítrico y el ascórbico o sintetizan otros como el glucónico y el oxálico, produciendo modificaciones en el pH y en el sabor. El crecimiento de mohos toxigénicos, productores de toxinas, y la consiguiente acumulación de estas sustancias en las frutas puede representar un serio problema ya que estas toxinas, que no se destruyen por los tratamientos térmicos corrientes aplicados a los zumos, pasarían a los zumos y derivados de fruta representando un grave peligro para la salud de los consumidores (Frank, 1968).

Algunos mohos como *Fusarium* y *Mucor* en ausencia de oxígeno pueden producir fermentaciones en las que se originan alcohol etílico y anhídrido carbónico (Muller, 1981). En este caso las formas vegetativas crecen sumergidas en el producto. Vicini *et al.* (1984) aislaron mohos productores de gas a partir de zumos de fruta envasados en "tetra brik" que mostraban una clara hinchazón. Las cepas aisladas fueron identificadas como *Mucor spinensis* y *Cephalosporium roseo-griseum*.

Algunos mohos son más termorresistentes que las levaduras y por ello pueden predominar en los productos pasteurizados (Marshall y Walkley, 1952). Las esporas conidiales y el micelio se destruyen a temperaturas entre 55 y 70 °C (Lubieniecki von Schelhorn, 1973), pero las ascosporas y los esclerocios son mucho más resistentes al calor y algunas sólo se destruyen a temperaturas superiores a los 80 °C.

10.3 Alteraciones por levaduras

Los zumos y cremogenados de frutas son los productos que mejor cubren las necesidades de las levaduras en lo referente a pH, condiciones nutritivas y oxígeno, por lo que son los microorganismos que más fácilmente crecen y se multiplican en estos alimentos. Muchas levaduras aisladas de frutas son capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis y son muy tolerantes a una elevada acidez, ya que pueden crecer a pH de 2,0 y 1,5. Sus necesidades nutritivas son mínimas; muchas pueden sintetizar una gran variedad de sustancias esenciales para el crecimiento, incluyendo aminoácidos, carbohidratos y vitaminas, y requieren concentraciones muy bajas de nitrógeno para crecer.

Las alteraciones producidas por el crecimiento anaerobio de levaduras se caracterizan por la producción de CO₂ y alcohol etílico, originados por la fermentación de los azúcares. También originan turbidez, sedimentos, flóculos, películas y agregados. Si producen pectinesterasa son capaces de destruir la turbidez natural debida a las pectinas (Baird y Kooiman, 1985). Son capaces de degradar los ácidos orgánicos (elevando el pH) y pueden formar acetaldehído, que contribuye al "olor a fermentado" (Cardona *et al.*, 1992).

Los principales géneros de levaduras causantes de alteraciones en los derivados de frutas son *Rhodotorula*, *Candida*, *Brettanomyces* y *Torulopsis* dentro de las levaduras asporógenas, y *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia* y *Saccharomyces* dentro de las levaduras esporógenas (Lubieniecki von Schelhorn, 1951; Sand, 1969).

Las especies de levaduras más representativas que Dragoni y Comi (1985) aislaron de zumos de fruta industriales fueron *Kloeckera apiculata*, *Pichia etchelsii*, *Torulopsis candida*, *Candida gilliermondii* y *Saccharomyces bailii* (*Zygosaccharomyces bailii*); sin embargo no detectaron la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*. Son muchos, en cambio, los investigadores que afirman que *Saccharomyces cerevisiae* es una de las especies más frecuentemente aisladas de derivados de fruta. Así, Deak y Beuchat (1993) afirman que *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más frecuente en concentrados de fruta y fue aislada en el 100 % de las muestras analizadas de concentrado de naranja y cereza. También se ha aislado *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida maltosa* en productos alterados de cítricos (Parish y Higgins, 1989) y en preparados comerciales de pomelo (Parish y Higgins, 1990).

Las contaminaciones por levaduras pueden presentarse en las distintas fases de elaboración de los zumos y cremogenados, aunque frecuentemente son responsables de fermentaciones durante el almacenamiento, aún cuando los productos se mantengan en refrigeración, ya que algunas especies pueden desarrollarse a bajas temperaturas (Pederson *et al.*, 1961; Peynaud y Domercq, 1964).

Como resultado de sus investigaciones Put *et al.* (1976) concluyeron que las levaduras que forman ascosporas tienen mayor resistencia al calor que las que no las forman, y establecieron que los valores D para las ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces chevalieri* eran diez veces mayores que para las formas vegetativas. Sin embargo, las esporas de las levaduras son mucho menos resistentes al calor que las esporas bacterianas. Put *et al.* (1976) también encontraron que *Saccharomyces cerevisiae* era la especie más termorresistente de todas las levaduras que aislaron de bebidas no alcohólicas. Otros muchos autores han estudiado la termorresistencia de levaduras aisladas de productos derivados de la fruta (Beuchat, 1982a; Stecchini y Beuchat, 1985; Torok y King, 1991b).

11 Modelos predictivos del crecimiento microbiano

La aplicación de modelos matemáticos para describir el crecimiento de los microorganismos en alimentos ha tenido un notable desarrollo en los últimos años. Según McMeekin *et al.* (1993), los principales factores que han contribuido a incrementar el interés por los modelos predictivos en microbiología de alimentos han sido dos. El primero de ellos ha sido el marcado aumento de las intoxicaciones provocadas por alimentos durante los años 80, lo que llevó a un mayor conocimiento, por parte de la opinión pública, de los requerimientos para una alimentación sana y segura. El segundo ha sido la comprensión de que los métodos microbiológicos tradicionales y muchos métodos "rápidos", que se utilizaban para determinar la calidad y la seguridad de los alimentos, estaban limitados por las necesidades de tiempo para obtener resultados y tenían muy poco valor predictivo. Buchanan (1991) apuntaba otro factor para explicar el aumento de los modelos predictivos: el espectacular desarrollo y el fácil acceso al poder de cálculo de los ordenadores.

En esencia, los modelos microbianos, se basan en expresiones matemáticas que describen el comportamiento de los microorganismos. Esto incluye expresiones que muestran los cambios en las poblaciones microbianas con el tiempo y cómo influye las condiciones ambientales sobre ese cambio (Whiting y Buchanan, 1994).

Los modelos microbianos constituyen valiosas herramientas, en la industria alimentaria, para predecir el crecimiento o supervivencia de los microorganismos. Los modelos pueden, de esta forma, aportar información muy útil para tomar decisiones acerca de la higiene y la vida útil de un producto, pudiéndose estimar los riesgos potenciales debidos al crecimiento de patógenos en un alimento tras un período de almacenamiento en determinadas condiciones, o establecer una fecha de caducidad para un producto mediante la estimación del

tiempo necesario para alcanzar un nivel especificado de alteración del producto o de población microbiana. Además también son útiles en otro tipo de situaciones relacionadas con la predicción del control de calidad, el desarrollo de nuevos productos, planes de trabajo y análisis de datos en laboratorios y en educación

11.1 Tipos de modelos microbianos

Los distintos modelos pueden ser clasificados en función del suceso que estudian o de las variables consideradas. Whiting y Buchanan (1993) proponen una clasificación en tres niveles, denominados primario, secundario y terciario. En el nivel **primario** se incluyen los modelos que describen los cambios de la población microbiana con el tiempo en unas determinadas condiciones. Aquí se incluyen los modelos de crecimiento y de inactivación/supervivencia microbiana. Los modelos del nivel **secundario** describen la variación de los parámetros de los modelos primarios con respecto a uno o más factores de cultivo o ambientales (pH, temperatura, atmósfera, etc...). En el nivel **terciario** se encontrarían las aplicaciones que ayudan a un mejor manejo de los modelos primarios y secundarios de forma que, mediante un uso adecuado de la información obtenida, permiten calcular y formular las predicciones, comparaciones y gráficas deseadas.

Dentro del nivel primario, los modelos matemáticos para describir el crecimiento microbiano pueden ir desde las, relativamente simples, apreciaciones basadas en las respuestas de crecimiento o no crecimiento a tratamientos más complejos donde se describen cuantitativamente cada una de las fases del ciclo de crecimiento microbiano. Un ejemplo del anterior método fue desarrollado por Meyer *et al.* (1989) para determinar los efectos del pH y la actividad de agua en el crecimiento del levaduras que producían alteraciones en diferentes grupos de alimentos.

Para modelizar el crecimiento microbiano en función del tiempo se utilizan con frecuencia curvas sigmoidales. Este tipo de funciones se eligen debido a que presentan cuatro fases, similares a las curvas de crecimiento microbiano, que comprenden una fase inicial de cambio lento, una fase de cambio acelerado, otra fase de cambio desacelerado y, finalmente, una fase estacionaria (Stannard *et al.*, 1985; Gibson, *et al.*, 1987; Baranyi *et al.*, 1992). De este modo, los modelos primarios permiten estimar parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento microbiano como la fase de latencia, el tiempo de generación, el ratio de crecimiento máximo y la densidad de población máxima de un microorganismo bajo determinadas condiciones (Skinner y Larkin, 1994). Los dos modelos primarios usados con mayor frecuencia son las funciones de Gompertz y la logística (Gibson, *et al.*, 1987). Si bien ambas funciones son sigmoidales, la diferencia entre ellas radica en que la función logística es simétrica alrededor del punto de ratio de crecimiento máximo, mientras que la función de Gompertz es asimétrica.

11.2 Modelo de Gompertz

El modelo más ampliamente utilizado para describir el crecimiento microbiano es la función de Gompertz modificada según Gibson *et al.* (1987). Se trata de una ecuación sigmoidal asimétrica de cuatro parámetros que viene dada por la expresión:

$$L(t) = A + C \exp(\exp(B(tM))) \quad (20)$$

siendo

$L(t)$ = logaritmo decimal del recuento de microorganismos a un tiempo t log(pfc/ml).

A = logaritmo decimal del recuento inicial de microorganismo log(pfc/ml).
 C = logaritmo decimal del incremento final de microorganismos log(pfc/ml).
 M = tiempo al cual el cultivo alcanza su máximo ratio de crecimiento (h).
 B = ratio de crecimiento relativo a M log(pfc/ml)/h.
 t = tiempo (h).

A partir de los parámetros A, B, C y M de la ecuación de Gompertz es posible calcular otros parámetros de crecimiento derivados como son el ratio de crecimiento exponencial (RCE), el tiempo de generación (TG), la fase de latencia (FL) y la densidad máxima de población (DMP) mediante las siguientes ecuaciones asociadas:

$$\text{RCE} = \frac{BC}{e} \quad [\log(\text{pfc/ml/h})] \quad (21)$$

$$\text{TG} = \frac{(\log 2)e}{BC} \quad [(\text{h})] \quad (22)$$

$$\text{FL} = M - \frac{1}{B} \quad [(\text{h})] \quad (23)$$

$$\text{DMP} = A + C \quad [\log(\text{pfc/ml})] \quad (24)$$

Este modelo ha sido muy utilizado últimamente por varios autores para describir la cinética de crecimiento en diversas especies bacterianas aisladas de alimentos: *Salmonella* y *Escherichia coli* (Gibson y Roberts, 1986 Buchanan y Bagi, 1994), *Aeromonas hydrophila* (Marchetti *et al.*, 1992), *Listeria monocytogenes* (Dalgaard *et al.*, 1994), *Yersinia enterocolitica* (Bhaduri *et al.*, 1994). Sin embargo la bibliografía existente sobre modelización de poblaciones de mohos y levaduras es mucho más escasa.

12 Métodos de control de los microorganismos

Uno de los mayores problemas con el que se enfrentan las industrias elaboradoras de derivados de fruta es el mantener los productos libres de microorganismos productores de fermentaciones, de enmohecimientos y de otros cambios perjudiciales que puedan alterar sus propiedades físicas y organolépticas. Para ello existen diversos métodos de conservación de este tipo de productos, como son, entre otros, mantenerlos bajo presión de dióxido de carbono, conservarlos en congelación, tratarlos con radiaciones, adicionarles conservantes, esterilizarlos por filtración o tratarlos térmicamente (pasteurización, esterilización). Todos estos sistemas van encaminados a destruir los microorganismos de los zumos y cremogenados o, al menos, a detener su actividad metabólica.

De todos los métodos enumerados en el párrafo anterior quizás sean la pasteurización, junto con la adición de conservantes químicos, los métodos más utilizados en la industria de los elaborados de frutas, aunque actualmente, y debido en parte a la demanda creciente por parte de los consumidores de productos "naturales" (sin aditivos ni conservantes químicos) y de una mayor calidad organoléptica, los esfuerzos de fabricantes e investigadores se dirigen hacia el desarrollo de nuevos métodos de conservación. Muchos de ellos son métodos combinados que permiten reducir las concentraciones de los conservantes y que parecen tener

un futuro muy prometedor (Beuchat, 1981a; 1982a). No obstante, los tratamientos térmicos son los métodos de conservación más habituales en la industria de los elaborados de fruta.

12.1 Conservación química

Como se ha dicho antes, se observa una tendencia general a sustituir la adición de antisépticos por otras técnicas de conservación igualmente eficaces.

Los conservantes químicos autorizados por la legislación española en la elaboración de zumos de frutas, de vegetales y sus derivados son: el ácido benzoico y sus sales de sodio, calcio y potasio, el ácido sórbico y sus sales de sodio, calcio y potasio, el ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, y el dióxido de azufre y sus derivados (Cenzano *et al.*, 1989).

El ácido benzoico se usa especialmente como agente micostático. Muchas levaduras y mohos se inhiben a concentraciones de 0,05-0,1 % de ácido no disociado, pero la mayor parte de las bacterias causantes de alteraciones son mucho más resistentes y no debe, por tanto, confiarse en el ácido benzoico para la conservación de alimentos capaces de permitir el crecimiento bacteriano (Chichester y Tanner, 1972). El ácido sórbico posee un amplio espectro de actividad contra los microorganismos catalasa-positivos, que incluyen las levaduras, mohos y bacterias, y se utiliza por tanto para inhibir los contaminantes aeróbicos en los alimentos fermentados o ácidos, ya que la eficacia máxima de este conservante tiene lugar a valores de pH ácidos, como los existentes en los zumos y cremogenados de frutas (Park y Marth, 1972). Las levaduras y los mohos de los géneros *Mucor* y *Penicillium* que producen alteraciones en los zumos y derivados de frutas, incluso los tipos termorresistentes, detienen su crecimiento a concentraciones de ácido sórbico del orden de 100 a 500 mg/l. No obstante, se conocen algunos microorganismos, como *Lactobacillus arabinosus*, que resisten concentraciones grandes de ácido sórbico y otros, como *Aspergillus Níger*, que son capaces de utilizarlo como sustrato. La concentración de ácido sórbico necesario para detener el crecimiento microbiano en los zumos de frutas disminuye al adicionarles ácido ascórbico o al mantenerlos en refrigeración a 0° C. Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico poseen un amplio espectro antimicrobiano y son inhibidores eficaces de levaduras, mohos y bacterias a pHs próximos a la neutralidad (Baird, 1983). El dióxido de azufre se utiliza ampliamente para controlar el crecimiento de los microorganismos no deseables de las frutas trituradas y zumos de frutas. En las frutas trituradas el SO₂ evita el crecimiento de *Botrytis*, *Cladosporium* y otros mohos (Clark y Takács, 1983).

La tolerancia a los conservantes químicos por parte de los microorganismos varía entre géneros, especies e incluso entre cepas. Muchas especies microbianas pueden adaptarse a concentraciones bajas de estos aditivos, por lo que se requieren concentraciones mucho mayores para inhibir su crecimiento.

12.2 Pasteurización

En la industria es necesario el conocimiento del tratamiento térmico conveniente para eliminar, de un producto determinado, una población microbiana e inactivar los enzimas. Este tratamiento térmico, sin embargo, deberá ser el más ajustado para que no se desencadenen una serie de reacciones no deseables como son:

- destrucción de componentes de importancia nutritiva como las vitaminas y provitaminas.
- aceleración de las reacciones entre azúcares y aminoácidos libres (reacciones de Maillard), dando lugar a productos de color oscuro y gusto amargo.
- hidrolización y liquefacción de almidones y otros polisacáridos.

- caramelización de los azúcares.
- destrucción de pigmentos coloreados (clorofilas, carotenos, xantofilas,...).
- desnaturalización de las proteínas.
- aceleración de la oxidación de las grasas.
- formación de productos tóxicos.

En definitiva, reacciones que afectan a las condiciones organolépticas y nutritivas del producto que es tratado térmicamente.

En el caso de cremogenados y derivados de fruta la destrucción de los microorganismos capaces de desarrollarse en el producto puede conseguirse con un tratamiento de pasteurización, es decir, calentando durante un período de tiempo determinado a una temperatura por debajo de 100 °C. Además con este tipo de tratamiento también se consigue inactivar los enzimas de la fruta.

El tratamiento de pasteurización aplicado en cada caso dependerá de:

La microflora

La termorresistencia de los microorganismos alterantes depende, entre otros factores, de las condiciones de crecimiento y de la presencia o no de esporas (Gibson, 1973).

El producto

El pH, la actividad de agua, la presencia de sustancias antimicrobianas y el tipo de producto son factores muy importantes que influyen sobre la resistencia térmica y el crecimiento de los microorganismos sobrevivientes (Juven *et al.*, 1978; Feig y Stersky, 1981; Beuchat, 1981a; 1982a).

Ya que el bajo pH de los zumos y cremogenados favorece la destrucción microbiana por el calor, en general es suficiente un calentamiento a 70-80 °C durante pocos minutos. En pasteurizaciones rápidas, donde se emplean temperaturas más altas, el tiempo necesario de calentamiento es menor.

13 Termorresistencia de los microorganismos

La temperatura es, probablemente, el factor ambiental más importante de cuantos afectan a la viabilidad y desarrollo de los microorganismos. Las temperaturas por encima de aquellas a las que los microorganismos crecen habitualmente producen inevitablemente su muerte o les provocan lesiones subletales. Exposiciones más drásticas provocan en las poblaciones homogéneas un progresivo y ordenado descenso del número de microorganismos debido a la muerte de un número de células tanto mayor cuanto más prolongado sea el tiempo de exposición (Olson y Nottingham 1983).

La termorresistencia de una célula o de una población microbiana está generalmente definida por el tratamiento térmico máximo que la célula o población microbiana es susceptible de soportar. Es necesario precisar que, desde un punto de vista práctico, por muerte microbiana se entiende la pérdida de la capacidad para reproducirse cuando se le coloca en condiciones idóneas para su multiplicación (Bidan, 1986).

Muchos microorganismos no esporulados responsables de la alteración de los alimentos son considerablemente más termorresistentes que los patógenos no esporulados, por lo que, normalmente, un tratamiento que elimine los microorganismos alterantes también destruirá a los patógenos.

13.1 Cinéticas de inactivación térmica

De entre los numerosos métodos que se han utilizado para estudiar la termorresistencia de los microorganismos, en lo concerniente a la evaluación del efecto del

tratamiento térmico, dos sobresalen por encima de los demás. El primero, muy próximo a la definición de termorresistencia, consiste en medir, después de un tratamiento térmico establecido, la probabilidad de no crecimiento de un volumen determinado de una suspensión homogénea de microorganismos en unas condiciones de cultivo determinadas. Se trata pues, de un análisis que permite evaluar el número más probable de supervivientes. El segundo método consiste en medir directamente, con un método apropiado, la supervivencia de una población microbiana dada. Se trata de un análisis de tipo "frecuencia de supervivientes" (Bidan, 1986).

Ya en 1921 Bigelow estudió las variaciones relativas de dos parámetros "temperatura" y "tiempo de tratamiento" para un mismo efecto fisiológico, y definió el tiempo de destrucción térmica (TDT) a la vez que establecía la relación logarítmica que existe entre el TDT y la temperatura de calentamiento. Desde entonces, y aunque se hayan observado excepciones, está perfectamente establecido que el orden de la termodestrucción es esencialmente logarítmico (o exponencial) (Brown y Melling, 1971; Stumbo, 1973), lo que permite estudiar la evolución de una población microbiana en función de la temperatura de tratamiento para un tiempo de exposición dado o en función del tiempo para una temperatura establecida.

13.1.1 Velocidad de termodestrucción microbiana

Según se ha dicho, la destrucción por calor de una población microbiana en un medio determinado sigue una cinética de primer orden (Cheftel *et al.*, 1982):

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (25)$$

de la que integrando se obtiene:

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (26)$$

donde

N es el número de microorganismos supervivientes al tratamiento térmico.

N_0 es el número de microorganismos inicial.

k es la constante de velocidad de destrucción de los microorganismos (min^{-1}).

t es el tiempo de tratamiento térmico (min.).

La [Figura 1-4](#) ejemplifica una gráfica típica de supervivencia microbiana. Representando el logaritmo del número de supervivientes al tratamiento a una determinada temperatura, en función del tiempo se obtiene una línea recta. Bajo condiciones fijas la velocidad de termodestrucción es constante e independiente del número inicial de células.

A partir de estas gráficas, se puede determinar el tiempo de reducción decimal, o valor D, que se define como el tiempo, en minutos, que es necesario para destruir el 90% de la población. Gráficamente viene representado como el tiempo necesario para que la curva de supervivencia atraviese un ciclo logarítmico. Los valores D deben indicar mediante un subíndice la temperatura a la que corresponden. Al calcular los valores D, generalmente, se asume el hecho de que el recuento de microorganismos decrece con el tiempo de acuerdo con una función puramente exponencial. Sin embargo, esto solamente es así para una cierta densidad de células y para determinados intervalos de tiempo. Quiere esto decir que solamente la fase de destrucción exponencial puede ser usada para la determinación exacta de los valores D.

Un factor básico que es preciso tener en cuenta en las curvas de supervivencia es la dependencia de la termorresistencia de numerosos factores, por lo que al definir los valores D es necesario precisar perfectamente no sólo el tipo de microorganismo, sino también el medio de tratamiento y otros factores influyentes.

13.1.2 Valor z

Si el valor D refleja la termorresistencia de un microorganismo a una determinada temperatura y en un determinado medio de tratamiento, los puntos de una gráfica de termodestrucción indican las resistencias relativas a las distintas temperaturas ([Figura 1-5](#)). Estas gráficas pueden construirse representando los logaritmos de los valores D en función de las temperaturas a las que corresponden. La pendiente de la gráfica se expresa en términos del valor z, que es el incremento de temperatura o el número de grados Celsius necesarios para que la gráfica de termodestrucción atravesase un ciclo logarítmico.

La pareja de valores D y z caracterizan la termorresistencia de un microorganismo en un medio bien definido. Por extrapolación es posible calcular el tratamiento térmico necesario para alcanzar un nivel de población microbiana determinado.

13.2 Factores que afectan a la termorresistencia

El número de factores que intervienen en la termorresistencia es tan grande que la interpretación de los resultados obtenidos de las investigaciones no resulta fácil. Esta idea fue magníficamente expresada por Schmidt (1957): "La multiplicidad de variables introducidas por el tipo de microorganismo estudiado, las técnicas utilizadas y la implicación de los diversos factores ya tratados, convierten en extremadamente difícil la interpretación razonable de los datos publicados". Basándose en las numerosas revisiones de los distintos factores que afectan a la termorresistencia microbiana (Schmidt, 1957; Hansen y Riemann, 1963; Roberts y Hitchins, 1969; Brown y Melling, 1971) éstos pueden clasificarse en tres tipos generales:

- Factores genéticos del microorganismo: como diferencias específicas y raciales, y entre esporos y células vegetativas.
- Factores ambientales que ejercen su influencia durante el crecimiento y la formación de las células o los esporos: como edad, temperatura y medio de cultivo.
- Factores ambientales que actúan durante el tratamiento térmico de las células o esporos: la naturaleza fisicoquímica del medio o menestruo en el que se realiza el calentamiento o tratamiento térmico. La bibliografía relativa hace alusión a diversos factores como pH, actividad de agua, medio de suspensión, tipo de alimento, a la presencia de sales, carbohidratos y de otros compuestos orgánicos o inorgánicos.

También son numerosos los estudios realizados con la finalidad de determinar la influencia de diversos factores sobre la termorresistencia de levaduras aisladas de zumos y derivados de frutas (Berger *et al.*, 1982; Beuchat, 1982a; 1983a; Jermini y Schmidt-Lorentz, 1987).

13.2.1 Influencia genética. Tipo de microorganismo

Esta influencia se pone de manifiesto por el hecho de que en las mismas condiciones de tratamiento térmico y en los mismos medios, las distintas especies de un género e incluso las diferentes cepas de una misma especie presentan termorresistencias diferentes.

Las esporas bacterianas son muy resistentes a las temperaturas extremas, llegando,

algunas de ellas, a sobrevivir a tratamientos de varios minutos a 120 °C. En cambio las células vegetativas de las bacterias esporuladas, al igual que las levaduras y hongos, presentan termorresistencias similares a las bacterias no esporuladas. La mayoría mueren tras unos minutos a 70-80 °C y en los alimentos húmedos, como los zumos y cremogenados, ninguna resiste una exposición momentánea a 100 °C.

Algunos autores, al estudiar la termorresistencia de distintos microorganismos aislados de vino, obtienen que las bacterias lácticas presentan una menor resistencia al calor que las levaduras (Splittstoesser *et al.*, 1975; Barillere *et al.*, 1983; Bidan, 1986). Resultados similares se han obtenidos con levaduras y lactobacilos aislados de cerveza (Tsang y Ingledew, 1982).

Put y De Jong (1980, 1982) realizaron un estudio de termorresistencia en 120 cepas de levaduras aisladas de bebidas no alcohólicas y de alimentos ácidos. Los resultados mostraron una sensibilidad generalmente más importante en las levaduras asporógenas que en las esporógenas. Entre estas, las especies del género *Saccharomyces* presentan la termorresistencia más alta, en particular las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces chevalieri* seguidas de *Saccharomyces bailii* y de *Saccharomyces uvarum*.

13.2.2 Edad de las células

No está claro el efecto de la edad de las células sobre su termorresistencia. De acuerdo con Esty y Meyer (1922), los esporos jóvenes son más resistentes que los viejos. Otros autores, en cambio, observan el efecto contrario (Curran, 1935), o no hallan correlación alguna entre edad y termorresistencia. Así, Condón *et al.* (1992), en sus estudios sobre *Aeromonas hydrophila*, llegaron a la conclusión que la edad de las células no afectó a su termorresistencia. Deveze y Ribereau-Gayon (1977) demostraron que para una cepa de *Saccharomyces bayanus*, la termorresistencia era mayor para cultivos más viejos. Es muy probable que la falta de claridad de los efectos de la edad sobre la termorresistencia sea debida a la no diferenciación entre los efectos del factor edad por sí mismo y la fase de desarrollo en que las células puedan encontrarse.

13.2.3 Fase de crecimiento

En trabajos con *Escherichia coli* se ha observado una mayor termorresistencia durante el período de latencia, al final de la fase logarítmica, y al comienzo de la fase estacionaria. Siendo ésta mínima al comienzo de la fase logarítmica (Elliker y Frazier, 1938). Estudios más recientes (Beuchat y Lechowich, 1968; Hurst *et al.*, 1974; Parry *et al.*, 1976) parecen justificar la conclusión de que la máxima sensibilidad a temperaturas elevadas tiene lugar durante la fase de crecimiento logarítmico.

13.2.4 Temperatura y medio de cultivo

Otro factor influyente en la termorresistencia es la temperatura de incubación del cultivo. La termorresistencia de todos los esporulados parece estar influenciada por la temperatura de esporulación. Así, si la esporulación tiene lugar a la temperatura óptima de crecimiento, o superior, su termorresistencia durante la fase estacionaria será apreciablemente superior que si el crecimiento hubiera tenido lugar a temperaturas inferiores. Las formas vegetativas presentan el mismo comportamiento que las esporuladas, como lo prueban las investigaciones realizadas por Schmidt, (1957) y Stumbo, (1973), quienes hallaron que, en general, cuanto más se aproxima la temperatura a la óptima durante la fase de crecimiento,

más elevada es luego su termorresistencia. Otros muchos trabajos confirman este comportamiento, entre ellos los de Tomlins y Ordal, (1976) y Beaman y Gerhardt (1986).

Estas diferencias en la termorresistencia según la temperatura de cultivo es lo que convalida la utilidad práctica del mantenimiento a bajas temperaturas y refrigeración de los alimentos que posteriormente van a ser tratados térmicamente, ya que con ello se evita el desarrollo de formas más termorresistentes que dificultarían tal tratamiento. Sherman *et al.* (1929) y Theophilus y Hammer (1938) fueron los primeros que pusieron de manifiesto la posibilidad de explotar en la práctica las diferencias en la termorresistencia debidas a la temperatura de cultivo.

El medio de cultivo y la riqueza en él de determinados nutrientes, también tiene un efecto importante sobre la termorresistencia de las células en él obtenidas, pero los efectos de diferentes componentes, solos o en combinación, son tan variables que hacen muy difícil sacar generalizaciones.

13.2.5 pH del medio de tratamiento

Quizás el factor que de un modo más importante afecta a la termorresistencia sea el pH y la acidez. La resistencia térmica de los microorganismos es generalmente máxima a valores de pH próximos a la neutralidad, entre 6,0 y 8,0, y decrece cuando el pH se hace más ácido (Montville y Sapers, 1981; Rodrigo *et al.*, 1990). Las investigaciones de Condón *et al.*, (1992) sobre *Aeromonas hydrophila* también parecen confirmar esto, dado que su máxima resistencia térmica fue hallada a pH 6,0 y la mínima a pH 4,0. Splittstoesser *et al.*, (1975) estudiaron el efecto del pH sobre la termorresistencia de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y otra de *Lactobacillus fructivorans* aisladas del velo del vino. Para los pH estudiados, no encontraron efectos significativos sobre la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae*; por el contrario, para *Lactobacillus fructivorans* la termorresistencia disminuyó con el pH. Otros autores, en cambio, afirman que las levaduras son más termosensibles cuanto más ácido es el pH del medio de tratamiento (Deveze y Ribereau-Gayon, 1977).

13.2.6 Actividad del agua

La reducción de la actividad de agua en el medio de tratamiento aumenta considerablemente la termorresistencia tanto en los esporos como en las células vegetativas, lo que se refleja en la necesidad de utilizar temperaturas de tratamiento más elevadas o tiempos más prolongados.

En trabajos sobre la influencia de la actividad de agua en *Zygosaccharomyces* se ha demostrado que la termorresistencia de sus células vegetativas estaba más influenciada por la actividad de agua que la de sus esporos. Sin embargo, también se ha demostrado que cuanto más bajos son los valores de la actividad de agua del medio de tratamiento, menores son las diferencias entre la termorresistencia de las células vegetativas y de los esporos (Jermini y Schmidt-Lorenz, 1987).

13.2.7 Composición del medio de tratamiento

Además del pH y de la a_w existen otros muchos elementos en la composición del medio que juegan un papel altamente importante en la resistencia térmica de los microorganismos. Algunos de los más significativos son el contenido en azúcares, la adición de conservantes alimentarios, la presencia y el tipo de ácidos orgánicos y la presencia de sales

(Gibson, 1973; Corry, 1976; Beuchat, 1981b; 1982a; 1987).

La mayoría de los autores están de acuerdo al afirmar que concentraciones altas de azúcar protegen a las células de levaduras contra la inactivación térmica. El aumento en la termorresistencia que presentó *Saccharomyces rouxii* y *Torulopsis globosa* al ser tratadas en un medio al cual se le había adicionado azúcar fue atribuido por Gibson (1973) a la deshidratación de las células y a la reducción del tamaño de poro de su pared celular. Beuchat (1982a) estudió la inactivación térmica de cinco cepas de levaduras en cinco zumos de fruta (albaricoque, manzana, uva, naranja y piña) con un 30 y un 50 % de azúcar añadido, encontrando que el azúcar ejercía un efecto protector de la células contra el tratamiento térmico. Pero, no sólo el contenido en azúcar es importante sino también el tipo de azúcar. Corry (1976) estudió la termorresistencia de *S. Rouxii* en soluciones de diferentes azúcares (tratada a 65 °C, pH 6,5 y a_w 0,95) obteniendo los valores más altos de termorresistencia en soluciones de sacarosa, valores intermedios en soluciones de sorbitol y los valores más bajos en glucosa y fructosa. Stecchini y Beuchat (1985) estudiaron la influencia de distintos azúcares en la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de melocotón, y encontraron que la presencia de sacarosa, glucosa y fructosa tenía un efecto protector.

Está demostrado que la presencia de ácido cítrico juega un papel importante en la resistencia térmica de las levaduras alterantes de zumo de naranja (Juven *et al.*, 1978). El ácido sórbico reduce la termorresistencia de *Aspergillus Níger* pero en cambio parece no tener efecto sobre *Penicillium thomii* (Shibasaki y Tsuchido, 1973).

También se han realizado trabajos en los que se ha estudiado el efecto combinado del tratamiento térmico y la adición de conservantes, bien solos o en combinación con azúcares (Beuchat, 1982b) o ácidos orgánicos (Beuchat, 1983b). Como resultado de dichos trabajos se concluyó que, a idéntico tratamiento térmico, las levaduras ensayadas fueron más rápidamente inactivadas en los zumos que contenían benzoato sódico que en aquellos que contenían concentraciones similares de sorbato potásico. Así mismo, el efecto letal del benzoato y del sorbato no pareció ser afectado por la presencia de altas concentraciones de ácidos orgánicos, pero, en cambio, fue reducido por la presencia de altas concentraciones de sacarosa.

La presencia de sales en el medio de calentamiento también puede afectar la termorresistencia de los microorganismos, aunque no existe consenso acerca de su efecto. La presencia de grasas o aceites ejercen un efecto protector de las células, de forma que, en aquellos alimentos con abundante cantidad de grasas, son necesarios tratamientos térmicos más drásticos.

Otro factor que está indirectamente relacionado con la termorresistencia, pero que es preciso tener en cuenta, es la recuperación de las células dañadas tras un tratamiento térmico. La composición de los medios, la adición de solutos o conservantes y la temperatura de almacenaje inmediatamente después del tratamiento térmico son factores que aparentemente influyen en la supervivencia y en la recuperación de las levaduras dañadas por el calor (Beuchat, 1982b).

14 El pardeamiento no enzimático

Según se ha visto anteriormente, tanto los cremogenados como los zumos clarificados son sometidos, a lo largo de todo su proceso de elaboración, a tratamientos térmicos de mayor o menor intensidad, tales como pasteurización, esterilización o concentración. Estos tratamientos, si bien necesarios, tienen efectos no deseados sobre el producto final, provocando cambios en el color, aparición de aromas desagradables, modificaciones en el sabor y pérdida o degradación de algunos de sus componentes nutricionales, como vitaminas,

azúcares y aminoácidos, y, además, conducen a la formación de productos resultantes de las reacciones de Maillard, 5-hidroxitilfurfural (HMF) y melanoidinas, que confieren al producto final coloraciones oscuras englobadas bajo el término de **pardeamiento no enzimático**. En los alimentos estas sustancias coloreadas pueden formarse principalmente por reacciones de "caramelización", oxidación del ácido ascórbico y por la reacción de Maillard (Hodge, 1953).

Caramelización

La caramelización o pirólisis de los azúcares monosacáridos se da cuando se calientan por encima de su temperatura de fusión, con reacciones de enolización, deshidratación y fragmentación, formándose derivados furánicos que por polimerización forman pigmentos oscuros. Si se trata de disacáridos debe de existir una hidrólisis previa. Los citados derivados furánicos, como el furfural y el 5-hidroxitilfurfural (HMF) pueden a su vez reaccionar con compuestos amínicos (reacción de Maillard).

Oxidación del ácido ascórbico

Esta sustancia se oxida con facilidad en presencia de aire, pasando a furfural con la consiguiente liberación de CO₂ (Braveraman, 1967; Kanner *et al.*, 1982; Marcy *et al.*, 1984). Este proceso se da en alimentos ácidos (pH = 2,0-3,5), y al calentar, y se puede producir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Esta oxidación tiene lugar en frutas en las que los grupos amino con los que puede reaccionar el ácido ascórbico son relativamente escasos. Tal es el caso de los cítricos y en especial del limón y del pomelo (Mariné, 1982)

Reacción de Maillard

Bajo la denominación de reacción de Maillard se incluye un complejo sistema de reacciones químicas que tienen lugar, durante los tratamientos térmicos, entre los grupos carbonilo y amino libre presentes en los alimentos, induciendo la formación de pigmentos pardos y componentes aromáticos en las últimas etapas de reacción (Baltes, 1981).

Muchos autores afirman que la reacción de Maillard es el mecanismo predominante en el pardeamiento no enzimático que tiene lugar durante la elaboración y almacenamiento de zumos y derivados de fruta, especialmente si se trata de fruta dulce (Joslyn, 1956; Cornwell y Wrolstad, 1981).

15 Mecanismos de reacción de Maillard

Los mecanismos químicos de la reacción de Maillard han sido ampliamente descritos por varios autores (Hodge, 1953; Wilson, 1975; Cheftel y Cheftel, 1980), según los cuales el desarrollo de la reacción de Maillard presenta siete tipos de reacciones diferentes, que pueden ser clasificadas de acuerdo a tres fases de desarrollo (Mariné, 1982):

I. Fase inicial (sin producción de color).

A) Condensación azúcar-amino: se trata de una condensación de los grupos carbonílicos, de aldosas y cetosas principalmente, sobre grupos amino de aminoácidos y proteínas para dar una glicosilamina N-sustituida.

B) Reagrupamiento de Amadori: tiene lugar la formación de cetosaminas a partir de aldosaminas. Esta reacción es catalizada por ácidos débiles y puede ser considerada como la etapa clave en la reacción de Maillard, pues en medios fuertemente ácidos al hidrolizarse la glicosilamina N-sustituida, puede revertir la reacción hacia los sustratos de partida (Nuñez y Laencina, 1990). En el caso de que el azúcar reaccionante sea una cetosa tiene lugar una reacción similar a la anterior, denominada reagrupamiento de Heyns-Carson, dando como producto de la reacción la formación de una aldossilamina (Nursten, 1981).

Durante el desarrollo de la fase inicial del pardeamiento (reacciones A y B) tiene

lugar una pérdida del valor nutritivo del alimento ya que se ve afectada la disponibilidad de aminoácidos, sin embargo los productos de reacción no confieren al alimento color ni aroma propios (Finot y Mauron, 1969).

II. Fase intermedia (incolora o con producción de ligeros colores amarillos).

C) Deshidratación de azúcares: se conocen dos tipos de reacciones de deshidratación de azúcares (Hodge, 1953). En sistemas ácidos se produce la formación de derivados del furfural. En sistemas casi anhidros con presencia de aminos tiene lugar la formación de reductonas.

D) Fragmentación de azúcares: el potencial de pardeamiento de los productos resultantes de la fragmentación de los azúcares varía considerablemente. Los compuestos que mantienen el grupo α -hidroxicarbonilo sufrirán pardeamiento solamente en soluciones acuosas, y, en presencia de compuestos amino, el pardeamiento se verá fuertemente acelerado. Los compuestos más altamente reactivos son el glucolaldehído, gliceraldehído, piruvaldehído, acetol, acetoína y diacetilo.

E) Degradación de Strecker: aminoácidos más dehidrorreductonas forman aldehídos con un átomo menos de carbono y liberación de CO_2 . Según Maillard (1912) el dióxido de carbono liberado durante las reacciones de pardeamiento proviene del grupo carboxilo del aminoácido y no del radical del azúcar. Según este proceso se explicaría la mayor parte, pero no la totalidad, del CO_2 formado a partir de sistemas azúcar-aminoácido. La producción de CO_2 sigue una evolución paralela a la formación del color y muestra la misma dependencia del pH (Wolfson, 1952).

III. Fase final (fuertemente coloreada).

En la fase final de pardeamiento tiene lugar la formación de polímeros coloreados. Las principales reacciones implicadas son la condensación aldólica, la polimerización aldehído-amina, y la formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos, tales como pirroles, imidazoles, piridinas y pirazinas.

F) Condensación aldólica: tiene lugar entre compuestos intermedios para formar pigmentos insaturados fluorescentes.

G) Polimerización de aldehídos con aminos: los aldehídos simples y las aminos reaccionan fácilmente a bajas temperaturas y forman productos polímeros coloreados.

16 Factores que afectan al pardeamiento no enzimático

La reacción de pardeamiento no enzimático no se desarrolla siempre de la misma forma, y tanto su velocidad como los productos finales que de ella se obtienen dependen de numerosos factores; los más importantes son: temperatura (Fox *et al.*, 1983; Karel, 1984), actividad de agua (Eichner y Karel, 1972), pH (O'Beirne, 1986) y la composición del alimento o medio (Buera *et al.*, 1987b). Nuñez y Laencina (1990), al enumerar los principales factores que afectan a las reacciones de pardeamiento no enzimático, coinciden con la relación anterior, aunque dentro del factor composición del medio destacan como factores más importantes el contenido y la naturaleza de los azúcares, de los aminoácidos y proteínas y el contenido en metales.

16.1 Temperatura y duración del tratamiento

Bajo las mismas condiciones, la temperatura de tratamiento es el factor que más influye sobre la velocidad de reacción. Además, también influye en la composición de los productos finales (Benzing-Purdie *et al.*, 1985). En general, un aumento de la temperatura de tratamiento provoca un aumento en la velocidad de reacción del pardeamiento no enzimático,

incluso en ausencia de catalizadores amino (Danehy y Wolnak, 1983). La duración de tratamiento influye en el número y diversidad de los productos finales de la reacción.

Estudios realizados en zumo de manzana concentrado de 75 °Brix, reflejan que para obtener un incremento del color inicial del 100 % es necesario almacenar el zumo durante más de 100 días a una temperatura de 20 °C, mientras que si la temperatura de almacenamiento aumenta a 37 °C, el tiempo necesario para obtener el mismo incremento de color se reduce a 20 días (Toribio y Lozano, 1984). Esto da una idea de la influencia de la temperatura en la velocidad del pardeamiento no enzimático en los zumos de frutas.

El pardeamiento no enzimático, como cualquier reacción química, sigue una cinética de reacción cuya constante de velocidad varía con la temperatura siguiendo el modelo de Arrhenius (González *et al.*, 1988b). En zumo concentrado de melocotón, el pardeamiento, determinado mediante la variación de la absorbancia a 420 nm, presenta una dependencia con la temperatura que puede expresarse según el citado modelo (González *et al.*, 1988a). En estos modelos, la energía de activación indica el grado de dificultad con que una reacción se desarrolla, así como su sensibilidad frente a la temperatura (González *et al.*, 1988b).

16.2 Actividad del agua

La actividad de agua también tiene una gran influencia sobre la velocidad de reacción de Maillard. A valores altos de a_w la velocidad de reacción es baja debido a que los reaccionantes se encuentran diluidos en el agua del medio; a valores de a_w bajos, como en alimentos sólidos, la reacción se ralentiza debido a la reducida movilidad de los reaccionantes. Por lo tanto, la velocidad de reacción es máxima cuando la actividad de agua se encuentra en el rango 0,6-0,7 (Loncin *et al.*, 1968; Eichner y Karel, 1972; Warmbier *et al.*, 1976). Toribio *et al.* (1984), tras estudiar la velocidad de pardeamiento no enzimático a distintas concentraciones de sólidos solubles en zumos de manzana, proponen que la máxima velocidad de reacción tiene lugar cuando la a_w del medio es de 0,55, que corresponde a zumos con una concentración en sólidos solubles en torno a 81 °Brix.

16.3 Acidez del medio

Acerca del efecto del pH en la reacción de Maillard, algunas investigaciones, en sistemas modelo y en alimentos, han demostrado que en general la reacción es inhibida por valores de pH bajos y favorecida por valores altos (Namiki y Hayashi, 1982; Ashoor y Zent, 1984), sin embargo, en zumo concentrado de manzana se ha observado comportamiento opuesto (O'Beirne, 1986). Cole (1967), al estudiar el efecto del pH sobre distintos sistemas modelo de azúcar/aminoácido, encontró que una disminución del pH provocaba un aumento del tiempo de retardo o inducción.

16.4 Composición del medio

La velocidad de la reacción de Maillard depende también de la composición del medio, y en especial, de las características de los diferentes azúcares y aminoácidos que lo forman, así como de la proporción entre ellos.

16.4.1 Naturaleza del azúcar

Young-Hye *et al.* (1986) estudiaron la capacidad de reacción de los azúcares en sistemas modelo, a pH 5,8, calentados a 100 °C durante 10 horas. Como resultado de sus

investigaciones concluyeron que la glucosa era más reactiva que la fructosa, ésta más que la lactosa, y que la sacarosa era la menos reactiva de los cuatro azúcares.

La sacarosa, como azúcar no reductor, sólo interviene en la reacción una vez que se ha producido su hidrólisis, que se ve favorecida por pH ácidos y elevadas temperaturas (Shallenberger y Mattick, 1983). En el caso de muchos zumos y cremogenados de frutas hay que destacar su notable contenido en sacarosa la cual, a las temperaturas de tratamiento durante el procesado de estos productos, puede hidrolizarse dando glucosa y fructosa y, por tanto, aumenta el contenido en azúcares reductores que pueden intervenir en las reacciones de Maillard (Basbky *et al.*, 1986).

16.4.2 Aminoácidos y proteínas del medio

El tipo de aminoácido influye en la composición de los productos aromáticos finales. El aminoácido más reactivo es la lisina, mientras que el ácido glutámico y el aspártico parecen tener un efecto inhibitorio de la reacción (Nafisi y Markakis, 1983).

Ashoor y Zent (1984), han comparado la reactividad de diferentes aminoácidos con algunos azúcares reductores, calentando sistemas modelo de azúcar/aminoácido a 121 °C durante 10 minutos. Como resultado de su estudio concluyeron que la lisina es muy reactivo, la alanina tiene una reactividad media y la arginina es poco reactiva. Además, la constante de reacción aumenta cuando el contenido en aminoácidos del medio aumenta (Toribio y Lozano, 1986).

Wong y Stanton (1992) encontraron que la presencia de aminoácidos en soluciones modelo que imitaban la composición de zumos concentrados de kiwi tenía una importancia considerable en el pardeamiento. Numerosos autores han investigado la eliminación de aminoácidos de varios zumos de frutas usando resinas de intercambio iónico y el efecto que esta eliminación de aminoácidos tiene sobre los niveles posteriores de pardeamiento. Así, se ha observado que la eliminación de aminoácidos provoca reducciones en el nivel de pardeamiento no enzimático en zumo de manzana (Príncipe y Lozano, 1991), en zumo concentrado de pera (Cornwell y Wrolstad, 1981), en zumo de limón (Clegg, 1964), en zumo de naranja (Joslyn, 1957) y en zumo de kiwi (Wong y Stanton, 1992).

17 Medida de la intensidad del pardeamiento no enzimático

Dada la complejidad de estas reacciones, es difícil establecer un mecanismo de reacción y, de este modo, deducir un modelo cinético preciso que las describa en su globalidad. En consecuencia, las metodologías utilizadas abordan su estudio desde distintos enfoques intentando describir la fenomenología observada mediante el seguimiento de distintos parámetros de fácil determinación y modelizables en expresiones matemáticas sencillas. Los indicadores de la reacción de Maillard más comúnmente utilizados son: evolución del color (absorbancia a 420 nm, evaluaciones colorimétricas) y determinaciones cualitativas y cuantitativas de reactivos, productos intermedios y finales (HMF, azúcares) (Eichner y Ciner-Doruk, 1981).

17.1 Evolución del color

Entre las alteraciones que tienen lugar en las características organolépticas de los zumos y cremogenados como consecuencia de las reacciones de pardeamiento no enzimático, hay que destacar, como una de las más importantes, las producidas en el color. Así pues, el color es un indicador indirecto de los compuestos coloreados formados, y, por lo tanto, la

medida de la variación del color con el tiempo de reacción permite determinar la cinética de pardeamiento no enzimático. La medida del color ha sido muy utilizada en estudios de pardeamiento no enzimático ya que es una determinación relativamente fácil de realizar.

Normalmente, el color se caracteriza mediante medidas espectrofotométricas a 420 nm para la detección de pigmentos pardos (Toribio y Lozano, 1986; Ibarz y Bermejo, 1991) y por evaluaciones colorimétricas como luminosidad y diferencia de color (Petriella *et al.*, 1985; Buera *et al.*, 1987a, 1987b; Remacha *et al.*, 1992).

17.1.1 El color y su medida

El color es el efecto de un estímulo sobre la retina que lo transmite al cerebro donde es interpretado. El estímulo consiste en la luz reflejada o transmitida por un objeto a partir de la luz que incide sobre él.

El ojo humano percibe la luz visible ($380 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$) y aprecia tres características (Durán, 1978): el tono o tipo de color, que responde a la dominancia de unas radiaciones a determinadas longitudes de onda sobre otras (rojo, amarillo, azul); la saturación o pureza, que describe el grado en que un color se separa del gris neutro y se acerca a un color puro del espectro (más rojo o menos rojo según la cantidad de gris presente en el color); la luminosidad o claridad, que es la cantidad de luz reflejada o transmitida por un objeto dentro de un mismo tono y saturación (brillante, luminoso).

Un objeto puede absorber, reflejar o transmitir parte de la luz que le llega. La proporción de luz que refleja o transmite puede variar según la longitud de onda de la luz incidente, debido a que los pigmentos no absorben de igual forma a todas las longitudes de onda (Cheftel y Cheftel, 1980).

La sensación de color percibida por un observador depende de las características del producto, del color e intensidad de la iluminación y del estado anímico en se encuentre. Por lo que el ojo humano no resulta un medio objetivo para realizar medidas de color (Ibarz, 1989).

Todo lo anterior muestra la necesidad de aplicar métodos instrumentales de medida, basados en las teorías físicas del color, que permitan interpretar, definir y comparar entre sí los diferentes colores de una forma objetiva y, al mismo tiempo, fácilmente reproducible. Entre los métodos más utilizados se encuentran los basados en medidas espectrofotométricas y posterior tratamiento matemático de los distintos parámetros indicativos del color.

La medida del color está normalizada a nivel internacional desde la reunión de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) celebrada en París en 1931 (Calvo, 1989). En esta reunión se estableció una nomenclatura y un espacio de color conocido como sistema CIE. Este sistema se basa en la posibilidad de reconstruir cualquier estímulo coloreado mediante una mezcla de cantidades adecuadas de tres estímulos fundamentales de color. La CIE estableció como colores fundamentales el rojo, el verde y el azul y se designaron como X, Y y Z. Por lo tanto, cualquier diferencia de color se manifestará como un ΔX , ΔY , o ΔZ , diferentes de cero, donde ΔX , ΔY , o ΔZ son las diferencias entre cada uno de los valores triestímulo de los colores en cuestión.

Para representar gráficamente los valores cromáticos, las coordenadas X, Y y Z de la CIE se pueden transformar en coordenadas tricromáticas:

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad (27)$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad (28)$$

$$Z = \frac{Z}{X + Y + Z} \quad (29)$$

Dado que $x + y + z = 1$, es posible determinar el color mediante dos coordenadas de cromaticidad: x e y .

Este sistema es excelente para representar mezclas aditivas, siendo además muy sencillo de manejar; sin embargo, es muy poco uniforme, por lo que con mucha facilidad conduce al usuario no familiarizado con él a errores. Es por ello que se han propuesto muchas modificaciones de este sistema, una de las más conocidas y usadas es el sistema Hunter (L , a , b) y los más recientes y oficialmente reconocidos como internacionales CIELAB y CIELUV.

En el año 1974, el Comité de Colorimetría TC-1.3 de la CIE propuso para su estudio dos espacios uniformes de color con sus correspondientes fórmulas de diferencias de color asociadas. Estos dos espacios se denominaron CIELUV y CIELAB. Por diferentes causas, ha sido el CIELAB (CIE L^* a^* b^*) el que se ha impuesto, y en la actualidad este espacio se usa cada vez más y la mayoría de los colorímetros que aparecen en el mercado dan directamente las coordenadas cromáticas CIELAB (Artigas *et al.*, 1985).

El espacio de color CIELAB se genera representando en coordenadas rectangulares las cantidades definidas por:

$$L^* = 116 (Y/Y_0)^{1/3} - 16 \quad (30)$$

$$a^* = 500 [(X/X_0)^{1/3} (Y/Y_0)^{1/3}] \quad Y/Y_0 > 0,01 \quad (31)$$

$$b^* = 200 [(Y/Y_0)^{1/3} (Z/Z_0)^{1/3}] \quad (32)$$

donde X , Y , Z son los valores triestímulos CIE correspondientes a la muestra y X_0 , Y_0 , Z_0 , las correspondientes al estímulo de referencia blanco (iluminante utilizado).

La diferencia de color y la diferencia de croma entre dos colores en este espacio vienen dadas por las expresiones:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (33)$$

$$\Delta C^* = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (34)$$

siendo:

$$\Delta L^* = L^* - L^*_0 \quad (35)$$

$$\Delta a^* = a^* - a^*_0 \quad (36)$$

$$\Delta b^* = b^* - b^*_0 \quad (37)$$

L^*_0 , a^*_0 y b^*_0 son los valores iniciales de los parámetros CIELAB.

Además de un sistema normalizado de medida, también deben estar normalizados el

iluminante con el que se ilumina el objeto a medir y el ángulo de observación del objeto, ya que estos dos parámetros influyen en la percepción del color. Los patrones de luz normalizadas que generalmente se utiliza son los iluminantes C, D₆₅ y D₇₅, y los ángulos de observación 2 ° y 10 °.

17.1.2 Absorbancia

La medida de la absorbancia a 420 nm (A_{420}) ha sido muy utilizada por distintos autores para estudiar el pardeamiento no enzimático en distintos zumos y concentrados clarificados de frutas expuestos a condiciones muy distintas de temperatura y tiempo de tratamiento o almacenamiento. Así, en zumos y concentrados clarificados de manzana, este parámetro ha sido utilizado por Beveridge *et al.*, (1986) e Ibarz y Navés (1995) para estudiar el pardeamiento no enzimático. También Toribio *et al.* (1984) utilizaron la absorbancia a 420 nm para estudiar el pardeamiento no enzimático en zumos clarificados concentrados de manzana, en el rango de concentraciones de 65-90 °Brix, durante su almacenamiento a 37 °C. Wong y Stanton (1992) usaron este mismo parámetro para evaluar el pardeamiento no enzimático en zumos concentrados de kiwi almacenados a 20 °C durante 5 meses. Beveridge y Harrison (1987) y Beveridge *et al.*, (1987) lo emplearon con zumos de pera concentrados de 45,2, 55,4, 65,1 y 72,5 °Brix almacenados durante 210 días a 37, 20, 13 y 2 °C. Ibarz *et al.* (1989a; 1989b; 1989c) también realizan varios estudios en zumos concentrados de pera en diferentes condiciones de concentración y temperaturas de tratamiento. Nagy, *et al.* (1990) en zumo de pomelo comercial envasado en latas y botellas, almacenado a temperaturas de 10 a 50 °C durante 18 semanas y Speers *et al.* (1987) en zumo de fresa en el rango de temperaturas de 20 a 45 °C.

En lo referente al melocotón, la medida de la absorbancia a 420 nm ha sido utilizada por González *et al.* (1988a) para estudiar la cinética de pardeamiento no enzimático en zumo concentrado clarificado en el rango de temperaturas de 50 a 90 °C. También Ibarz *et al.* (1993) se basan en este parámetro para determinar el efecto de las altas temperaturas en el pardeamiento no enzimático de zumos de melocotón de 15, 30, 45 y 55 °Brix al ser sometidos a tratamientos a temperaturas de 100 a 108 °C, durante 90 minutos.

La A_{420} nm también se ha utilizado para estimar la evolución del pardeamiento no enzimático en distintos sistemas modelo, como aspartamo/glucosa y glicina/glucosa sometidos a condiciones de altas temperaturas, de 70 a 90 °C (Stamp y Labuza, 1983), o en soluciones modelo simulando zumo clarificado de manzana, que contenían azúcares, ácidos orgánicos y los aminoácidos asparagina, ácido aspártico y ácido glutámico (Lozano, 1991). Estas soluciones se prepararon a 50, 60 y 70 °Brix y se almacenaron a temperaturas de 15 a 37 °C durante 180 días.

17.2 Variables colorimétricas

La diferencia de color (ΔE^*), diferencia de croma (ΔC^*), la luminosidad (L^*) y los parámetros a^* y b^* del sistema CIELAB son variables colorimétricas ampliamente utilizadas para caracterizar la evolución del color en alimentos.

En estudios realizados en pulpas de ciruela, melocotón y albaricoque se han utilizado la diferencia de color (ΔE^*), la luminosidad (L^*) y los parámetros a^* y b^* para determinar la cinética del pardeamiento no enzimático (Remacha *et al.*, 1992). Estas variables también han sido usadas, con la misma finalidad, en pulpas concentradas de frutas por Lozano *et al.* (1994).

Ghazala *et al.* (1991) estudiaron las cinéticas de formación del color a altas

temperaturas en soluciones acuosas de glucosa y glicina. La formación de color fue evaluada usando parámetros CIE (luminosidad y las coordenadas cromáticas, x e y).

17.2.1 Índice de pardeamiento

Como se ha dicho antes, el pardeamiento no enzimático engloba una compleja serie de reacciones químicas, por lo que el primer problema que se plantea a la hora de determinar su evolución es la elección de las variables correctas. Con la finalidad de solventar este problema algunos autores han definido nuevos índices que permitan realizar un seguimiento adecuado del pardeamiento no enzimático. Así, Buera *et al.* en 1985, realizan estudios de pardeamiento en sistemas modelos de alta actividad de agua que contenían mezclas de distintos azúcares y aminoácidos, y proponen un nuevo índice, denominado índice de pardeamiento ("index of browning", BR) para su estudio. El índice de pardeamiento (BR) viene expresado por la ecuación:

$$BR = \frac{x - 0,31}{0,172} \quad (38)$$

siendo $x = X/(X+Y+Z)$, donde X, Y y Z son las coordenadas triestímulo definidas según la "Commission Internationale de l'Eclairage" (CIE) para el iluminante C y observador colorimétrico 2°. Son pocas las referencias bibliográficas en las que se utiliza este índice como parámetro para describir el pardeamiento no enzimático en zumos.

17.3 HMF y azúcares

Las principales sustancias químicas que se desarrollan en los procesos de pardeamiento no enzimático son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF). El contenido en HMF es importante por que indica el grado de calentamiento al que han sido sometidos los productos durante su procesado (Resnik y Chirife, 1979). El HMF es uno de los índices más utilizados en el estudio del pardeamiento no enzimático en zumos y derivados de frutas, y es considerado como un indicador de la intensidad del tratamiento térmico a que han sido sometido los zumos (Toribio y Lozano, 1987; Aleixandre y Serrano, 1989).

En la bibliografía existen numerosos trabajos en los que se evalúa el HMF como indicador del pardeamiento no enzimático en diversos zumos y cremogenados de frutas tratados en diferentes condiciones de temperaturas y contenido en sólidos solubles: en zumo clarificado de manzana con un contenido en sólidos solubles de 15 a 70 °Brix y a temperaturas de 100 a 108 °C (Toribio y Lozano, 1987); en zumo concentrado de pera de 70,4 °Brix y a temperaturas de 4 a 50 °C (Ibarz *et al.*, 1989a); en zumo de naranja envasado en "tetra-brik", almacenado a 2 °C, 20 °C y 40 °C durante cinco meses (Ventura *et al.*, 1990); en zumo de melocotón concentrado, 15-64,5 °Brix, tratados a altas temperaturas, 100-108 °C, (Ibarz *et al.*, 1993). Guzmán *et al.* (1986) eligieron el HMF como indicador de la repercusión de diversas operaciones de tratamiento en la calidad final del cremogenado de albaricoque.

Los azúcares reductores presentes en los derivados de fruta, principalmente fructosa y glucosa en el caso del cremogenado de melocotón, intervienen directamente en las reacciones de pardeamiento no enzimático, además algunos disacáridos, como la sacarosa, pueden hidrolizarse durante el procesado de los cremogenados debido a las temperaturas de tratamiento, lo que origina la formación de glucosa y fructosa. Así pues, la evolución del contenido en azúcares, especialmente de la sacarosa, fructosa y glucosa, pueden servir de

indicadores de la evolución del pardeamiento no enzimático. Babsky *et al.* (1986) estudiaron la evolución de estos azúcares en zumo de manzana concentrado (72 °Brix) durante su almacenamiento a lo largo de 111 días. Bajo estas condiciones la sacarosa se hidrolizaba según una cinética de primer orden, al mismo tiempo que los azúcares reductores experimentaban un incremento que venía determinado por la hidrólisis de la sacarosa, pero detectaron un consumo de azúcares reductores atribuible a las reacciones de pardeamiento. Garza *et al.* (1996) también han estudiado la evolución de la concentración de sacarosa, glucosa y fructosa en zumo de manzana (11 °Brix) durante su tratamiento térmico a altas temperaturas (80-98 °C), encontrando que el contenido en sacarosa, disminuye de forma continuada a medida que aumenta el tiempo y la temperatura de tratamiento, mientras que la glucosa y la fructosa no presentan una tendencia definida.

18 Cinéticas de pardeamiento no enzimático

Para el estudio de las reacciones de pardeamiento no enzimático es imprescindible conocer su cinética y, en concreto, la velocidad con la que se produce el pardeamiento, aspecto que viene dado por la constante de velocidad. También es importante conocer el efecto de la temperatura y de la concentración sobre la cinética de la reacción. A pesar de todo, la multitud de componentes y la complejidad de las reacciones obliga a obtener una aproximación cinética experimental (González *et al.*, 1988b).

En la bibliografía se informa de que la mayoría de las reacciones que están relacionadas con la pérdida de calidad por efecto del pardeamiento no enzimático pueden ser explicadas por cinéticas de orden cero o de primer orden; sin embargo, las diferencias estadísticas entre ambos tipos son pequeñas (Labuza y Riboh, 1982).

Numerosos autores (Labuza y Saltmarch, 1981; Singh *et al.*, 1983; Stamp y Labuza, 1983; Toribio y Lozano, 1986; Buera *et al.*, 1987a; Barbanti *et al.*, 1990) sostienen que la formación de compuestos coloreados como consecuencia del pardeamiento no enzimático siguen una reacción de orden cero.

18.1 Modelos cinéticos para la evolución del color

En las reacciones de pardeamiento no enzimático existe un periodo inicial de inducción que corresponde a la etapa de Maillard de formación y acumulación de compuestos carbonílicos que posteriormente darán lugar a la formación de compuestos coloreados. Una vez superado el periodo de inducción el color del producto aumenta linealmente con el tiempo (cinética de orden cero) o aumenta exponencialmente (cinética de primer orden), o bien, asintóticamente a un valor máximo (cinética más compleja) (Labuza, 1972; Saguy *et al.*, 1978; Toribio y Lozano, 1984; González *et al.*, 1988b).

En general la aparición de color en los productos alimentarios sigue una ley potencial (Lozano, 1985):

$$\frac{dP_i}{dt} = k_i P_i^n \quad (39)$$

Donde P_i representa la propiedad considerada que varía en función del tiempo, k_i la constante de velocidad y n corresponde al orden de reacción.

Estas reacciones suelen ser de orden cero o uno, siendo difícil discernir entre ambas, si no se deja desarrollar la reacción durante el tiempo suficiente (Beveridge y Harrison, 1984;

Toribio y Lozano, 1984; Lozano, 1985).

18.1.1 Cinética de orden cero

En esta cinética se considera que la variación de la propiedad considerada es independiente de la concentración de los reactivos, por lo que en la expresión potencial se considera $n = 0$, y por lo tanto:

$$\frac{dP}{dt} = k_0 \quad (40)$$

Integrando esta ecuación diferencial entre un tiempo inicial y un tiempo, t , cualquiera:

$$P = P_0 + k_0 t \quad (41)$$

Si se consideran variables adimensionales:

$$\frac{P}{P_0} = 1 + k t \quad (42)$$

Donde P es el valor de la propiedad considerada para un tiempo cualquiera, P_0 es el valor inicial de la propiedad, t es el tiempo, k_0 la constante cinética de orden cero, y:

$$k = \frac{k_0}{P_0} \quad (43)$$

En el caso del color, la propiedad considerada equivaldrá a la variable colorimétrica estudiada en cada momento.

Según este modelo la variación del color del cremogenado debido a las reacciones de pardeamiento no enzimático, es directamente proporcional a la k_0 y al tiempo de reacción. La representación de este modelo da lugar a rectas de pendientes k_0 o k , por lo que un aumento de estas constantes implicará un aumento de la velocidad de pardeamiento.

18.1.2 Cinética de primer orden

En este caso se considera que la velocidad a la que varía la propiedad considerada es proporcional a la misma propiedad, es decir, a la concentración de compuestos poliméricos coloreados que se están formando. Así pues, en la expresión potencial se considera $n = 1$, quedando:

$$\frac{dP}{dt} = k_1 P \quad (44)$$

Integrando:

$$P = P_0 \exp (k_1 t) \quad (45)$$

Donde P, P₀, y t tienen el mismo significado que en la cinética anterior de orden cero, y k₁ es la constante cinética de primer orden.

Si se expresa de forma adimensional, la expresión anterior queda de la forma:

$$\frac{P}{P_0} = \exp (k_1 t) \quad (46)$$

En este caso la propiedad considerada varía exponencialmente con el tiempo, es decir, en el caso del color, la formación de compuestos coloreados aumenta cada vez más rápidamente a medida que tiene lugar el pardeamiento no enzimático.

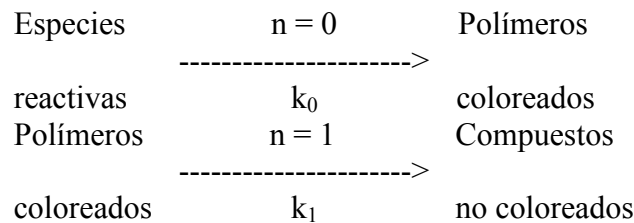
Linealizando se obtiene la expresión:

$$\ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = k_1 t \quad (47)$$

De este modo, la variación de la propiedad (ln P/P₀) con respecto al tiempo viene representada por una recta cuya pendiente viene dada por la constante cinética de primer orden, k₁. A medida que k₁ aumenta las rectas son más pronunciadas y, por tanto, la velocidad de pardeamiento es mayor (González *et al.*, 1988b).

18.1.3 Cinética combinada

En algunas ocasiones, los modelos anteriores, relativamente sencillos, no representan adecuadamente la cinética de las reacciones del pardeamiento no enzimático. A fin de solventar este inconveniente se ha desarrollado una cinética combinada en la cual se considera que el pardeamiento no enzimático consta de dos etapas (González *et al.*, 1988b). La primera consiste en la formación de compuestos poliméricos coloreados, y sigue una cinética de reacción de orden cero; la segunda supone la descomposición de los polímeros coloreados en compuestos no coloreados, y sigue una cinética de primer orden. Según esta cinética combinada el proceso de pardeamiento no enzimático puede esquematizarse de la siguiente forma:



Por lo tanto, la expresión matemática del modelo cinético queda de la forma:

$$\frac{dP_i}{Dt} = K_0 - K_1 P \quad (48)$$

Integrando la expresión anterior, calculando la constante de integración y agrupando

los términos, se obtiene la expresión de la cinética combinada:

$$P = \frac{k_0}{k_1} \left[\frac{k_0}{K_1} - P_0 \right] \exp(-k_1 t) \quad (49)$$

Particularizando la propiedad (P) para la absorbancia en forma adimensional:

$$\frac{A}{A_0} = \frac{k_0}{k_1 A_0} \left[\frac{k_0}{K_1 A_0} - 1 \right] \exp(-k_1 t) \quad (50)$$

Para las variables colorimétricas, diferencia de color (ΔE^*) y diferencia de croma (ΔC^*), la ecuación queda de la forma:

$$\Delta E^* = \frac{k_0}{k_1} (1 - \exp(-k_1 t)) \quad (51)$$

$$\Delta C^* = \frac{k_0}{k_1} (1 - \exp(-k_1 t)) \quad (52)$$

18.2 Modelos cinéticos para la formación de 5-hidroximetilfurfural (hmf)

El HMF puede formarse por diferentes vías: por deshidratación en medio ácido de hexosas y por reacción de Maillard a partir de azúcares reductores y grupos amino libres de los aminoácidos. (Feather, 1982; Hosoney, 1989). La deshidratación ácida de hexosas para formar HMF está catalizada por el mismo HMF, por lo cual se puede considerar que la reacción de formación de HMF es **autocatalítica de segundo orden** (Shallenberger y Mattick, 1986). Por tanto la reacción global puede expresarse:



Ibarz *et al*, (1989a) plantean el siguiente desarrollo: se puede deducir que la variación de HMF con el tiempo será:

$$\frac{dC_{\text{HMF}}}{dt} = K C_{\text{H}} C_{\text{HMF}} \quad (53)$$

Expresión en la que C_{HMF} y C_{H} son las concentraciones de HMF y de hexosas, y k es la constante de velocidad en unidades de l/mol.t.

Con objeto de integrar la ecuación diferencial, es preciso expresar la C_{H} en función de la C_{HMF} . Por eso, ha de tenerse presente que por cada mol de hexosas que desaparece, no aparece más que uno de HMF, luego entonces, se cumplirá:

$$C_0 = C_{\text{HMF}} + C_{\text{H}} = C_{\text{HMF}}^0 + C_{\text{H}}^0 = \text{constante} \quad (54)$$

Donde la C_0 es la concentración global en cualquier momento, y C_{HMF}^0 y C_{H}^0 son las concentraciones iniciales de HMF y de hexosas respectivamente.

Esta igualdad permite expresar la concentración de azúcares en función de la de HMF:

$$\frac{dC_{\text{HMF}}}{dt} = k (C_0 - C_{\text{HMF}}) C_{\text{HMF}} \quad (55)$$

Integrando esta expresión considerando que para: $t = 0 \rightarrow C_{\text{HMF}} = C_{\text{HMF}}^0$, resulta:

$$C_{\text{HMF}} = \frac{1}{\frac{1}{C_0} + B \exp(-K t)} \quad (56)$$

Siendo:

$$B = \frac{C_0 - C_{\text{HMF}}^0}{C_{\text{HMF}}^0 C_0} \quad (57)$$

$$K = C_0 k \quad (58)$$

En el caso de que la $C_{\text{H}} \gg \gg C_{\text{HMF}}$, la concentración de hexosas podría englobarse dentro de la constante de velocidad y quedaría una expresión correspondiente a una **cinética de primer orden**:

$$C_{\text{HMF}} = C_{\text{HMF}}^0 \exp(k_1 t) \quad (59)$$

Siendo, en este caso,

$$k_1 = k C_{\text{H}} \quad (60)$$

Según esta cinética de primer orden la concentración de HMF es una función exponencial del tiempo de reacción.

Para cualquiera de los dos modelos descritos, para tiempos pequeños de reacción se obtiene que la concentración de HMF coincide con la inicial.

18.3 Modelos cinéticos para la variación de azúcares

La desaparición de las hexosas (glucosa y fructosa) durante la reacción de Maillard fue estudiada por Shallenberger y Mattick (1983), de forma que dedujeron que, a pH mayor de 2, la formación de HMF a partir de los azúcares sigue una cinética de primer orden. A pesar de todo, establecieron que los resultados sobre desaparición de azúcares obtenidos en

soluciones patrones son cuestionables, ya que el medio donde realmente se producen las reacciones es mucho más complejo que una solución modelo. Por tanto, las reacciones, en realidad, no tienen un orden bien definido y, con bastante probabilidad la cinética se ve afectada por numerosos factores. Además, las reacciones de los azúcares son diferentes según el pH del medio, y puesto que el pH varía a lo largo del proceso, la reacción no puede ser descrita perfectamente por un modelo simplificado.

Por último, Shallenberger y Mattick (1983) afirman que el HMF se forma casi exclusivamente a partir de la fructosa, siendo despreciable la proporción de HMF procedente de la glucosa, que sigue la misma reacción que la fructosa una vez isomerizada en ésta. También Lee *et al.* (1988) observaron una pérdida gradual de azúcares con el tiempo y la temperatura de almacenamiento en zumos de cítricos, y ponen de manifiesto que la fructosa es la mayor fuente potencial para la formación de HMF. Trifiro *et al.* (1995) confirmaron este comportamiento de la fructosa durante el almacenamiento de zumos frescos de naranjas.

Baisier y Labuza (1992) en estudios sobre la reacción de Maillard en soluciones patrón de glucosa y glicina, dedujeron que la glucosa desaparecía según una cinética de **seudo-primer orden**.

$$-\frac{dC_G}{dt} = k C_G \quad (61)$$

Donde la C_G corresponde a la concentración de glucosa.

Pero la desaparición de la glucosa según esta cinética depende en gran medida de la disponibilidad de aminoácidos en el medio. De acuerdo con Baisier y Labuza (1992) la reacción transcurre según una cinética de segundo orden respecto a la concentración de glucosa y aminoácidos, pero este hecho es de difícil cuantificación si no se tienen datos acerca de la evolución de los aminoácidos disponibles en el medio a lo largo del transcurso de la reacción.

Baisier y Labuza (1992) proponen una cinética de orden cero para la formación de melanoidinas y compuestos intermedios a partir de azúcares.

18.3.1 Modelos cinéticos para la sacarosa

En cuanto al disacárido sacarosa, éste sufre una reacción de hidrólisis, hecho que adquiere una gran importancia, ya que supone una aportación de fructosa y glucosa al medio, y, por tanto, también es preciso incluir este mecanismo dentro de la cinética de los azúcares, lo que complica la interpretación del comportamiento cinético. Babsky *et al.* (1986) encontraron que la hidrólisis de la sacarosa, cuando el contenido en agua del medio es elevado, se comporta como una reacción de **seudo-primer orden**:

$$-\frac{dC_s}{dt} = k C_s \quad (62)$$

Donde C_s es la concentración de sacarosa para un tiempo t . Integrando la expresión anterior y teniendo en cuenta que para $t = 0$ la concentración de sacarosa (C_s) es igual a la concentración de sacarosa inicial (C_s^0), se obtiene la expresión:

$$C_s = C_s^0 \exp(-k_1 t) \quad (63)$$

que expresada en forma adimensional y linealizada queda de la forma:

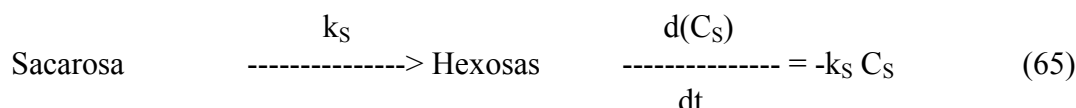
$$\ln \left(\frac{C_s}{C_s^0} \right) = -k_1 t \quad (64)$$

18.3.2 Modelos cinéticos para las hexosas

A partir de las cinéticas mencionadas antes para los distintos azúcares, se ha intentado deducir una cinética global que abarque los procesos seguidos por los tres azúcares. Para ello se proponen tres modelos distintos.

Modelo 1:

En este modelo se ha tenido en cuenta la concentración total de hexosas ($C_H = C_{FR} + C_G$) obtenida sumando la concentración de fructosa (C_{FR}) y la de glucosa (C_G). Además se ha considerado que la sacarosa se hidroliza, según una cinética de primer orden, para formar hexosas; las hexosas a su vez participan en las primeras etapas de la reacción de Maillard siguiendo una cinética de orden cero (Baisier y Labuza, 1992) y, finalmente, el HMF se forma a partir de hexosas según una cinética de primer orden. Es decir, las expresiones de las distintas reacciones son:



La ecuación diferencial de velocidad de reacción para las hexosas queda:

$$\begin{aligned} \frac{d(C_H)}{dt} &= k_S C_S - k_{HMF} C_{HMF} - k_H = \\ &= k_S 2C_S^0 \exp(-k_S t) - k_{HMF} C_{HMF}^0 \exp(k_{HMF} t) - k_H \end{aligned} \quad (68)$$

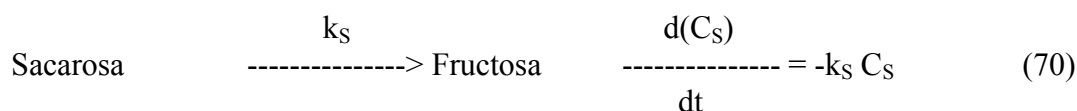
Puesto que en la hidrólisis de la sacarosa a partir de un mol de ésta se forman dos moles de hexosas (uno de glucosa y otro de fructosa), es necesario multiplicar por dos la concentración de sacarosa. Integrando se obtiene la expresión:

$$C_H = C_H^0 + 2C_S^0 [1 - \exp(-k_S t)] + C_{HMF}^0 [1 - \exp(k_{HMF} t)] k_H t \quad (69)$$

En este caso las concentraciones se expresan en moles/litro. Las constantes cinéticas de las reacciones de formación de HMF (k_{HMF}) y de aparición de hexosas (k_S), que coincide con la de desaparición de la sacarosa, pueden conocerse. Solamente falta por conocer la constante cinética de la reacción de las hexosas para formar compuestos de Maillard.

Modelo 2:

En este modelo se considera solamente la concentración de la fructosa (C_{FR}), la cual aparece por hidrólisis de la sacarosa según una reacción de primer orden, desaparece para formar HMF según una cinética de primer orden (Shallenger y Mattick, 1983; Lee y Nagy, 1988; Trifiro *et al.*, 1995), e interviene en las reacciones de Maillard siguiendo una cinética de orden cero.



Como en el modelo 1, considerando la ecuación diferencial de velocidad de reacción de la fructosa:

$$\begin{aligned} \frac{d(C_{FR})}{dt} &= k_S C_S - k_{HMF} C_{HMF} - k_{FR} = & (73) \\ &= k_S C_S^0 \exp(-k_S t) - k_{HMF} C_{HMF}^0 \exp(k_{HMF} t) - k_{FR} \end{aligned}$$

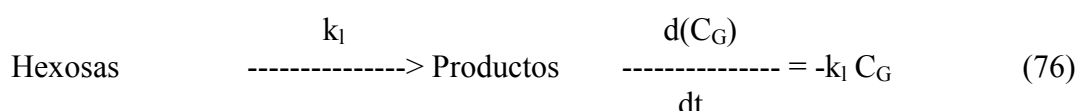
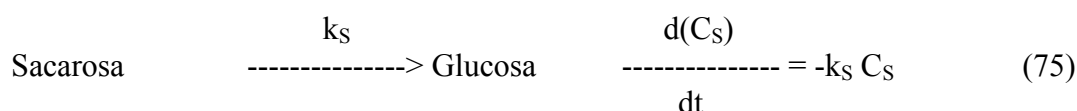
En este caso, un mol de sacarosa proporciona un mol de fructosa, por lo que no hay que multiplicar por dos la sacarosa. Integrando se obtiene:

$$C_{FR} = C_{FR}^0 + C_S^0 [1 - \exp(-k_S t)] + C_{HMF}^0 [1 - \exp(k_{HMF} t)] - k_{FR} t \quad (74)$$

Igual que en el modelo 1, las constantes k_{HMF} y k_S pueden conocerse, y solamente hay que calcular la constante k_{FR} .

Modelo 3:

En este modelo en lugar de considerar la concentración de fructosa se trabaja con la de glucosa (C_G), la cual aparece por hidrólisis de la sacarosa siguiendo una cinética de primer orden, interviene en las primeras etapas de la reacción de Maillard según una cinética de orden cero y desaparece en una reacción de carácter general siguiendo una cinética de primer orden (Bisier y Labuza, 1992).



$$\text{Hexosas} \xrightarrow{k_G} \text{Prod. Maillard} \quad \frac{d(C_G)}{dt} = -k_G \quad (77)$$

La ecuación diferencial de la velocidad de reacción de la glucosa es:

$$\begin{aligned} - \frac{dC_G}{dt} &= k_S C_S - k_I C_G - k_G = & (78) \\ &= k_S C_S^0 \exp(-k_S t) - k_I C_G^0 \exp(k_I t) - k_G \end{aligned}$$

Integrando se obtiene:

$$C_G = C_G^0 + C_S^0 [1 - \exp(-k_S t)] + C_G^0 [\exp(k_I t) - 1] k_G t \quad (79)$$

En este caso se desconocen las constantes de las dos reacciones de desaparición de la glucosa, k_I y k_G . Con la expresión anterior, trabajando en moles/litro es posible calcularlas.

II Objetivos

Esta tesis se enmarca dentro de las líneas de investigación del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida.

El objetivo fundamental es la caracterización de los principales aspectos del cremogenado de melocotón, así como el estudio de las cinéticas de deterioro que, por sus características, tienen una gran trascendencia desde el punto de vista del proceso y de la conservación del producto, y en definitiva de la calidad final del cremogenado de melocotón.

Caracterización Reológica

- 1.- Caracterización físico-química del cremogenado de melocotón.
- 2.- Caracterización reológica del cremogenado de melocotón: Comportamiento al flujo, influencia de la temperatura y de la concentración en dicho comportamiento.

Caracterización Microbiológica

- 1.- Caracterización de la microflora presente en el cremogenado de melocotón.
- 2.- Determinación de la microflora potencialmente alterante del cremogenado de melocotón.

Cinéticas de Deterioro

- 1.- Determinación del comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* durante el almacenamiento de cremogenado de melocotón.
- 2.- Determinación de la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3.- Estudiar las cinéticas de deterioro que, por efecto del pardeamiento no enzimático, tienen lugar en el cremogenado de melocotón al ser tratado a elevadas temperaturas.
- 4.- Determinar los modelos cinéticos que describen el pardeamiento no enzimático mediante diferentes parámetros colorimétricos.
- 5.- Determinar la evolución de los compuestos que intervienen en el pardeamiento no enzimático del cremogenado de melocotón: HMF y azúcares.

III Plan de trabajo

- 0.- Revisión bibliográfica.
- 1.- Obtención de las muestras.
- 2.- Caracterización físico-química del cremogenado de melocotón.

Caracterización Reológica:

- 1.- Preparación de las muestras a distintas concentraciones: 11, 14, 19,5, 24 y 29°Brix.
- 2.- Análisis reológico de las muestras.
- 3.- Análisis de los datos experimentales y ajuste a distintos modelos reológicos.

Caracterización Microbiológica:

- 1.- Aislamiento e identificación de la microflora presente en el cremogenado de melocotón.
- 2.- Detección y caracterización de los microorganismos potencialmente alterantes.
- 3.- Confirmación del carácter alterante de los microorganismos aislados y caracterizados como potencialmente alterantes.

Cinéticas de Deterioro:

- 1.- Pruebas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de melocotón.
- 2.- Pruebas de termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3.- Pruebas de pardeamiento no enzimático: preparación de las muestras a diferentes concentraciones: 11, 20, 30 y 40 °Brix.
- 4.- Tratamientos térmicos de las muestras a 80, 85, 90, 95 y 98 °C.
- 5.- Medidas colorimétricas (Absorbancia a 420 nm y espectros de reflectancia).
- 6.- Determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del contenido de HMF y azúcares.
- 7.- Análisis de los datos experimentales y ajuste a distintos modelos cinéticos.

IV Material y métodos

1 Material

1.1 Muestras ensayadas

La materia prima estudiada fue cremogenado de melocotón industrial suministrado por la empresa transformadora Indulleida S.A., ubicada en la comarca del Segriá (Alguaire, Lleida).

1.2 Microorganismos

Todos los microorganismos que se utilizaron a lo largo de este trabajo fueron aislados a partir de las muestras de cremogenado de melocotón analizadas.

En las pruebas de evolución de la población microbiana y de termorresistencia se trabajó con tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas cepas fueron seleccionadas de entre todas las existentes por su capacidad para alterar el cremogenado de melocotón.

1.3 Disolventes y reactivos químicos

Todos los reactivos y disolventes utilizados de grado analítico, salvo que se indique lo contrario, fueron de Panreac (Montplet & Esteban, Barcelona), y los disolventes de grado HPLC de Scharlau S.A.

1.4 Patrones

Los patrones de HMF y azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) utilizados en cromatografía HPLC fueron de Sigma Co.

1.5 Aparatos y material científico específico

- Refractómetro:

Se utilizó un refractómetro digital ATAGO, modelo RX-100.

- Contador de colonias:

Se utilizó un contador de colonias digital AMS PROTOS.

- pH-metro:

Se utilizó un pH-metro marca CRISON, modelo MicropH 2001.

Cromatógrafo líquido de alta resolución

El equipo de cromatografía estaba formado por los siguientes componentes:

Desgasificador en línea Knauer Desgasser.

Controlador de gradiente Waters 600 Controller.

Detector de absorbancia Waters 486 Detector Absorbance.

Detector de índice de refracción Waters 410 Differential Refractometer.

Integrador Waters 746 Data Module.

- Actividad de agua:

Se utilizó un aparato NOVASINA, modelo Humidat IC-I.

- Espectrofotómetro:

Se utilizó un espectrofotómetro MACBETH, modelo Color-Eye 3000. La toma de

datos y su tratamiento se realizó mediante un ordenador personal equipado con el programa Macbeth OPTIVIEW.

- Termorresistómetro:

Se utilizó un termorresistómetro TR-SC (Pat. 87.00948) del Departamento de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y descrito por Condón *et al.* (1989).

- Viscosímetro:

Se utilizó un viscosímetro de cilindros concéntricos HAAKE Rotovisco RV 12 equipado con una unidad de medida M500 (par de torsión máximo 4,90 N cm) y un sistema de atemperación externo que permite fijar la temperatura del vaso de medición y por tanto la de trabajo. El sistema sensor empleado fue del tipo NV, que consta de un vaso exterior fijo y de un rotor con forma de campana ([Figura 4-1](#)) y cuyas características técnicas se describen en la Tabla 4-1.

Sistema sensor	NV
Cilindro interior (rotor):	
Radio interior, R ₂ (mm)	17,85
Radio exterior, R ₃ (mm)	20,1
Longitud L (mm)	60
Cilindro exterior (vaso):	
Radio interior, R ₁ (mm)	17,5
Radio exterior, R ₄ (mm)	20,5
Radii Ratio R _a /R _i	1,02
Volumen de muestra (cm ³)	9
Temperatura máxima (°C)	100
Temperatura mínima (°C)	-30
Factores de cálculo:	
A (Pa/gradiente de escala)	1,78
M (min/s)	5,41
G (mPa.s/gradiente de escala.min)	329

Características técnicas del sistema sensor NV (según HAAKE, 1983).

Conectado a este equipo se encuentra el instrumento básico de medida con el que es posible seleccionar la velocidad de giro del rotor (N), y en el que se puede leer el momento angular del par de torsión (S) correspondiente a cada velocidad de cizallamiento.

- Centrífuga:

Se utilizó una centrífuga BECKMAN modelo J2-21.

2 Métodos

2.1 Caracterización físico-química del cremogenado de melocotón

Los análisis que se llevaron a cabo para la caracterización físico-química del cremogenado de melocotón se realizaron, en aquellos casos en los que existen, siguiendo los Métodos oficiales para análisis de zumos de frutas, otros vegetales y sus derivados, aprobados en la Orden de 29 de enero de 1988 (MAPA, 1993).

En aquellos análisis para los que no existen métodos oficiales se utilizaron los propuestos por Organismos Nacionales o Internacionales de reconocida solvencia. En estos casos se ha indicado expresamente la metodología seguida para cada análisis en particular.

Para cada una de las siguientes determinaciones se realizaron cinco repeticiones.

2.1.1 Preparación de las muestras de cremogenado

Se tomaron aproximadamente unos 400 g de cremogenado y se diluyeron hasta un litro con agua destilada. Se mezcló y se homogeneizó antes de cada toma de muestra.

2.1.2 Grados Brix

La determinación del contenido en sólidos solubles se realizó por medida del índice de refracción y conversión en grados Brix mediante un refractómetro ATAGO RX-1000. Las medidas se realizaron a 20 °C.

2.1.3 pH

La medida del pH de las muestras se realizó por potenciometría a 20 °C mediante un pH-metro Crison micro-pH 2001.

2.1.4 Acidez total

La acidez total se determinó por valoración potenciométrica con una disolución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 8,1. Los resultados se han expresado en gramos de ácido cítrico/100 ml de muestra, teniendo en cuenta el factor de dilución.

2.1.5 Nitrógeno total

El nitrógeno total se determinó por el método Kjeldahl, mediante una digestión del cremogenado de melocotón con ácido sulfúrico concentrado, en presencia del catalizador (100 g H₂SO₄; 10 g Cu₂SO₄·5H₂O y 1 g de selenio en polvo) hasta decoloración completa en un digestor P-SELECTA Bloc Digest 12. El amoniaco producido durante la digestión fue recogido sobre ácido bórico. Posteriormente se valoró con ácido clorhídrico, y se calculó la cantidad inicialmente presente de nitrógeno orgánico y amoniacal en la muestra de cremogenado.

2.1.6 Índice de formol

El índice de formol se determinó tomando 25 ml de muestra que se neutralizaron con hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 8,1, utilizando un pH-metro. Se añadieron 10 ml de solución de formaldehído al 35 %. Al cabo de un minuto se efectuó la valoración de la solución con hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 8,1.

2.1.7 Hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldehído) (HMF)

La determinación de HMF se hizo por cromatografía líquida de alta resolución, por las mismas razones que en los azúcares.

La metodología seguida y condiciones de trabajo utilizadas se explican

detalladamente en el apartado.

2.1.8 Azúcares

Los azúcares que se han estudiado en el presente trabajo han sido: sacarosa, glucosa y fructosa.

La determinación de los azúcares se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que se consideró que se trata de un método simple y rápido, y que da óptimos resultados, como alternativa al Método Oficial, que resulta de mayor complejidad.

La metodología seguida y condiciones de trabajo utilizadas se explican detalladamente en el apartado.

2.1.9 Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua se determinó en un NOVASINA Humidat IC-I, previamente calibrado a 20 °C.

2.1.10 Fibra

El contenido en fibra se determinó, según el método de la AOAC (1990), por sucesivos lavados con agua seguidos de centrifugación a 3600 rpm, y lavados con hidróxido de sodio 0,1 N. Se filtró y se dejó una noche en estufa a 60 °C, determinándose el contenido en fibra por pesada.

2.1.11 Pectinas

El contenido en pectinas se determinó según el método recomendado por la International Federation of Fruit Juice Producers (IFFJP, 1964).

Las sustancias pécticas se precipitaron con alcohol. A partir del residuo se determinaron, después de las extracciones oportunas, las pectinas solubles en agua, las pectinas solubles en oxalato y las pectinas solubles en álcali o protopectinas. Se añadió carbazol y ácido sulfúrico a las respectivas extracciones y se realizaron las medidas de la absorbancia en espectrofotómetro 525 nm. Se realizó una curva de calibrado utilizando como patrón ácido galacturónico.

2.1.12 Pulpa

El contenido en pulpa se determinó centrifugando 50 g de cremogenado de melocotón durante 15 minutos a 15000 rpm, expresando los resultados como porcentaje de pulpa separada respecto del peso de la muestra inicial (Durán y Jiménez, 1980).

2.2 Aspectos reológicos

2.2.1 Obtención de las muestras

Las muestras de cremogenado inicial, procedentes de una industria local en envases asépticos de plástico, fueron almacenadas en una cámara frigorífica a una temperatura de refrigeración de 5 °C hasta su posterior utilización. El tiempo de permanencia de las muestras en la cámara frigorífica no superó los 30 días.

Las muestras para la caracterización reológica se obtuvieron a partir del cremogenado industrial de melocotón de 11 °Brix. A partir de dicho producto, y por concentración mediante evaporación en un rotovapor Büchi, trabajando a una presión de 40 mm de Hg, se consiguieron muestras con las siguientes concentraciones en sólidos solubles: 14, 19,5 24 y 29 °Brix.

2.2.2 Medidas reológicas

Todas las medidas reológicas se llevaron a cabo con un viscosímetro de cilindros concéntricos Rotovisco RV12 (Haake) equipado con una unidad de medida M500 y un sistema sensor del tipo NV provisto de un cilindro exterior fijo y de un rotor de forma campaneiforme que permite dos superficies de cizalladura. Además, dispone de un sistema de atemperación que, mediante la circulación de un fluido procedente de un baño termostatzado exterior, permite seleccionar la temperatura de trabajo deseada.

A continuación se detalla la forma de trabajo que se siguió con cada una de las muestras para realizar la medidas reológicas. Se colocaron 9 ml de cremogenado de melocotón en el vaso del sistema sensor, poniendo especial atención en retirar, en aquellos en los que fue preciso, el exceso de muestra mediante una jeringa o pipeta con el fin de evitar posibles errores en las medidas. Posteriormente se seleccionó la temperatura de trabajo deseada y una vez estabilizada, y con la finalidad de eliminar la posible tixotropía que pudiera presentar el producto, se procedió a cizallar la muestra a la máxima velocidad de giro del rotor, 512 min^{-1} , durante 1 minuto. Para cada una de las muestras las mediciones se realizaron a 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, y $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las velocidades de giro del rotor se pueden seleccionar en el rango de 0,01 a 512 min^{-1} . Para cada velocidad de giro o cizallamiento (N) seleccionada, el aparato devuelve la lectura del par de torsión (S) correspondiente. A partir de estos pares de valores es posible calcular los pares de valores de esfuerzo cortante (τ) y velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), según las instrucciones del fabricante, mediante la siguientes expresiones:

$$\tau = 1,78 S \text{ (Pa)} \quad \dot{\gamma} = 5,41 N \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

La lectura del par de torsión a cada velocidad de giro del rotor se midió en primer lugar a velocidades decrecientes del rotor comenzando por la velocidad máxima, y una vez alcanzada la velocidad mínima, se realizó otra serie de medidas aumentando gradualmente la velocidad de giro hasta el valor inicial. De esta forma se obtuvieron las mediciones por duplicado para cada muestra. La experiencia se repitió tres veces para cada una de las concentraciones de cremogenado de melocotón, obteniendo de este modo, seis repeticiones de los valores. Por tanto, el valor final del esfuerzo cortante para cada una de las velocidades de deformación es un valor medio resultante de las seis lecturas puntuales.

En algunos casos no fue posible evaluar los valores del esfuerzo cortante a velocidades de giro bajas, mientras que en otros caso, la dificultad se presentó a velocidades de giro altas. Esto fue debido a las limitaciones propias del equipo, cuya escala de medidas disponible viene limitada por el rango básico de medidas del aparato, ya que el fabricante aconseja ajustarse a él con objeto de minimizar el error de las medidas.

2.2.3 Cálculo de los parámetros reológicos

Representando los valores del esfuerzo cortante frente a los de la velocidad de deformación, se construyeron, para cada una de las concentraciones, los reogramas

correspondientes a las distintas temperaturas de trabajo.

Los valores experimentales se ajustaron a los modelos de la ley de la potencia de Ostwald-De Waale ($\tau = K \dot{\gamma}^n$) y al de Herschel y Bulkley ($\tau = \tau_0 + K_H \dot{\gamma}^n$), ya que estos dos modelos son los más ampliamente citados en la bibliografía para caracterizar reológicamente purés y zumos de frutas y hortalizas. De los resultados de los ajustes se obtuvieron los parámetros reológicos de los índices de consistencia (K) y de los índices de comportamiento al flujo (n) correspondientes a los modelos anteriores, así como los respectivos coeficientes de determinación, r^2 .

La viscosidad (η) es el valor alcanzado por la relación $\tau / \dot{\gamma}$ a cualquier velocidad de cizallamiento. El valor de la viscosidad aparente (η_a) para los fluidos pseudoplásticos que siguen el modelo de Ostwald-De Waale, se calcula con la expresión: $\eta_a = K \dot{\gamma}^{n-1}$ y la de los que se ajustan al modelo de Herschel y Bulkley con: $\eta_a = \tau_0 / \dot{\gamma} + K \dot{\gamma}^{n-1}$. Se determinaron los valores de la viscosidad aparente para distintas velocidades de deformación.

Los valores de la energía de activación, calculados a partir de la variación de los distintos parámetros con la temperatura, se obtienen mediante ajuste no lineal a la ecuación de Arrhenius:

$$\eta_a = \eta^\infty \exp(E_a/RT) \quad (80)$$

en la que: η_a es la viscosidad aparente a una determinada velocidad de deformación, η es una constante, E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. La función puede linealizarse tomando logaritmos y la representación de $\ln \eta_a$ frente a $1/T$ da lugar una recta. El antilogaritmo de la ordenada en el origen es el valor de η , y a partir del valor de la pendiente (E_a/R) se calcula en valor de E_a .

Para determinar el efecto de la concentración sobre el comportamiento reológico del cremogenado de melocotón se han ensayado el modelo potencial ($\eta = K_1 C^{A1}$) y el modelo exponencial ($\eta = K_2 \exp(A_2 C)$).

2.3 Aspectos microbiológicos

2.3.1 Toma de muestras

Para la caracterización de la flora microbiana del cremogenado de melocotón industrial se analizaron 92 muestras durante un período de 2 años. La toma de muestras se realizó en la propia industria. La distribución de las muestras analizadas se expone a continuación:

- 14 muestras de cremogenado de melocotón triturado y precalentado hasta 95 °C antes de la homogeneización y la pasteurización.

- 73 muestras de cremogenado de melocotón acabado, es decir ya pasteurizado a 107 °C durante 45 segundos y posteriormente enfriado y envasado en condiciones asépticas en tanques refrigerados.

- 5 muestras de cremogenado de melocotón visiblemente alterado.

Las muestras se transportaron desde la fábrica al laboratorio en condiciones de refrigeración, donde se conservaron a 4 °C hasta su análisis, que tuvo lugar antes de 8 horas.

Las muestras fueron preparadas para su control y análisis mediante una homogeneización por agitación, con el objeto de conseguir que los resultados obtenidos fuesen realmente representativos de las muestras de donde proceden.

2.3.2 Medios de cultivo y tampones

2.3.2.1 Normas generales de preparación de medios de cultivo

- 1.- Se pesan las sustancias que componen el medio.
- 2.- Se disuelven en la cantidad de agua destilada correspondiente.
- 3.- Se ajusta el pH del medio, mediante pH-metro, con 1M HCl y 1M NaOH.
- 4.- Se distribuye el medio de la siguiente forma:

Si es líquido, se vacía en matraces Erlenmeyer o bien se distribuye en tubos y se tapan. Si es sólido, se añade la cantidad de agar correspondiente y se lleva a ebullición con agitación para disolver el agar. Se vacía en matraces Erlenmeyer o bien se distribuye en tubos y se tapan.

- 5.- Se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15-20 minutos.

6.- Los medios líquidos se dejan enfriar. Los matraces que contienen medios con agar o sólidos se reparten, en condiciones asépticas, en placas Petri. Los tubos con medios sólidos se dejan enfriar en posición inclinada.

2.3.2.2 Agar almidón

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Almidón soluble	0,2 g
Agar nutritivo	100 ml

Ajustar pH del medio a 7,2.

2.3.2.3 Agar citrato de Simmons

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Cloruro sódico	5 g
Sulfato magnésico heptahidratado	0,2 g
Fosfato monoamónico	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Citrato sódico	5 g
Azul de bromotimol, solución acuosa al 1 %	8 ml
Agar	15 g
Agua destilada	990 ml

Ajustar el pH del medio a 7,0.

2.3.2.4 Agar extracto de malta (MEA)

(Samson *et al.*, 1995)

Composición:

Extracto de malta	30 g
Peptona micológica	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar pH del medio a 5,4.

2.3.2.5 Agar leche

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Leche descremada reconstituida	10 ml
Agar nutritivo	100 ml

Ajustar pH del medio a 7,2.

2.3.2.6 Agar nutritivo

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Caldo nutritivo	1 litro
Agar	15 g

Ajustar pH del medio a 7,2.

2.3.2.7 Agar para recuento en placa (PCA)

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Peptona	10 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar pH del medio a 7,0.

2.3.2.8 Agar patata glucosada (PDA)

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Extracto de patata concentrado	200 ml
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar pH del medio a 5,5.

2.3.2.9 Agar Sabouraud

(Pharmacopée française, 1986)

Composición:

Dextrosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar pH del medio a 5,4.

2.3.2.10 Agar urea de Christensen

(Christensen, 1946)

Composición:

Peptona	1 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato monopotásico	2 g
D-glucosa	1 g
Rojo fenol, solución acuosa al 0,2 %	6 ml
Agar	20 g
Agua destilada	1 litro
Solución de urea al 20 %	20 ml

2.3.2.11 Agua de peptona nitrato

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Nitrato potásico	0,2 g
Triptona	10 g
Cloruro sódico	5,0 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar el pH del medio a 7,2.

2.3.2.12 Agua de peptona tamponada

(ICMSF, 1983)

Composición:

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	9 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Agua destilada	1 litro

pH aproximado = 7.

2.3.2.13 Base de carbono para levaduras

(Difco, 1976)

Composición:

Bacto-Yeasts Carbon Base	11,7 g
Fuente de nitrógeno	equivalente a 5 g nitrato potásico
Agua destilada	100 ml

pH aproximado = 5,6.

Se consigue una solución concentrada 10 veces. Se esteriliza por filtración y se guarda en refrigeración hasta su utilización. El medio definitivo se prepara colocando 0,5 ml del mismo en 4,5 ml de agua destilada estéril.

2.3.2.14 Base de nitrógeno para levaduras

(Difco, 1976)

Composición:

Bacto-Yeats Nitrogen Base	6,7 g
Hidrato de carbono	equivalente a 5 g de glucosa
Agua destilada	100 ml

pH aproximado = 5,6.

Se consigue una solución concentrada 10 veces. Se esteriliza por filtración y se guarda en refrigeración hasta su utilización. El medio definitivo se prepara colocando 0,5 ml del mismo en 4,5 ml de agua destilada estéril.

2.3.2.15 Caldo glucosa fosfato

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Peptona	5 g
D-glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar pH del medio a 7,5.

2.3.2.16 Caldo Man, Rogosa, Sharpe (MRS)

(Man *et al*, 1960)

Composición:

Peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotásico	2 g
Acetato sódico	5 g
Citrato triamónico	2 g
Sulfato magnésico heptahidratado	200 mg
Sulfato de manganeso tetrahidratado	50 mg
Agua destilada	1 litro

Ajustar el pH del medio a 6,2-6,6.

2.3.2.17 Caldo nutritivo

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Cloruro sódico	5 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar el pH del medio a 7,2.

2.3.2.18 Caldo nutritivo con 2% de NaCl

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Cloruro sódico	20 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar el pH del medio a 7,2.

2.3.2.19 Caldo para fermentación de azúcares

(Wickerham, 1951).

Composición:

Extracto de levadura	4,5 g
Peptona	7,5 ml
Azul de bromotimol al 1%	0,6 ml
Agua destilada	1 litro

Ajustar el pH del medio a 7,2.

2.3.2.20 Extracto de patata concentrado

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Patata	200 g
Agua destilada	500 g

Se cortan las patatas peladas en pequeños trozos cúbicos. Se ponen a hervir en el agua destilada durante 1 hora. Se filtra, y se completa el filtrado, hasta 200 ml con agua destilada. Se conserva en congelación.

2.3.2.21 Medio de crecimiento con arabinosa como única fuente de carbono

(Sneath, 1986)

Composición:

Bifosfato diamónico	1 g
Cloruro potásico	0,2 g
Sulfato magnésico heptahidratado	0,2 g
Extracto de levadura	0,2 g
Púrpura de bromocresol al 1 %	0,6 ml
Agar	15,0 g
Arabinosa	5,0 g
Agua destilada	1 litro

Ajustar el pH del medio a 7,0.

2.3.2.22 Medio de jugo de tomate semisólido de Gibson

(Gibson y Abd-el-Malek, 1945)

Composición:

Extracto de levadura	2,5 g
D-glucosa	50 g
Jugo de tomate, pH 6,5	100 ml
Leche descremada reconstituida	800 ml
Agar nutritivo	200 ml

Ajustar el pH del medio a 6,5.

2.3.2.23 Medio gelatina nutritiva

(Harrigan y McCance, 1979).

Composición:

Gelatina	15 g
Caldo nutritivo	100 ml

Ajustar el pH del medio a 7,2.

2.3.2.24 Medio NaCl y KCl

(Sneath, 1986).

Composición:

Glucosa	30,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Cloruro sódico	1,0 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	40,0 mg
Sulfato magnésico heptahidratado	0,5 g
Cloruro cálcico dihidratado	0,3 g
Sulfato ferroso heptahidratado	2,5 mg
Molibdato amónico	2,0 g

MEDIO 14 AMINOÁCIDOS:

DL alanina	80 mg/l
DL ácido aspártico	100 mg/l
L arginina	160 mg/l
Acido L glutámico	500 mg/l
Glicina	80 mg/l
L histidina	160 mg/l
L leucina	100 mg/l
DL metionina	160 mg/l
DL fenilalanina	200 mg/l
DL serina	80 mg/l
DL triptófano	200 mg/l
L tirosina	140 mg/l
L cisteína	250 mg/l
DL valina	320 mg/l

VITAMINAS:

Biotina	1 g
Acido fólico	2 g
Riboflavina	100 g
Tiamina	500 g
Acido nicotínico	500 g

Hidrocloruro de piridoxina	500g
Pantotenato cálcico	500g
Agua destilada completar a	1 litro

2.3.2.25 Tampón McIlvaine pH 4

(McIlvaine, 1921)

Composición:

Ácido cítrico monohidratado	12,91 g
Sodio fosfato dibásico anhidro	10,95 g
Agua destilada	1 litro

2.3.2.26 Tampón McIlvaine pH 7

(McIlvaine, 1921)

Composición:

Ácido cítrico monohidratado	3,078 g
Sodio fosfato dibásico anhidro	23,388 g
Agua destilada	1 litro

2.3.3 Recuentos microbiológicos

2.3.3.1 Recuento de aerobios mesófilos (30 °C)

Para cada una de las muestras analizadas se procedió de la forma que se detalla a continuación:

Se tomaron 10 g de cremogenado de melocotón y se homogeneizaron con 90 ml de solución salina estéril en un mezclador-homogeneizador Stomacher (Modelo 400, Seward Laboratory) durante un minuto. Se preparó un banco de diluciones decimales con solución salina estéril. Mediante una pipeta estéril, se sembraron dos placas Petri estériles con 1 ml de cada una de las diluciones preparadas. Posteriormente se vertieron en cada placa unos 15 ml del medio agar para recuento en placa (PCA) estéril, fundido y mantenido a 45-48 °C. Se mezcló con agitación suave, para repartir uniformemente la muestra en el medio, y se dejó solidificar. Las placas se incubaron, en posición invertida, a 30 °C durante 72 horas (ICMSF, 1983). Transcurrido el período de incubación se procedió al recuento de todas aquellas colonias que habían aparecido en la placa. Para ello se eligieron aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias por placa. El número de colonias obtenido se multiplicó por el factor de dilución correspondiente y se expresó el resultado como partículas formadoras de colonias por gramo (pfc/g).

2.3.3.2 Recuento de mohos y levaduras

Se utilizó el mismo procedimiento que en el apartado anterior salvo que el medio de cultivo utilizado en este caso fue agar Sabouraud y el periodo de incubación fue de 4 a 5 días.

2.3.3.3 Recuento de bacterias lácticas

El recuento se hizo por el método del número más probable (NMP) (Koch, 1981) y usando como medio de cultivo el caldo Man, Rogosa, Sharpe (MRS).

Los tubos se inocularon con 1 ml de la dilución correspondiente y se incubaron a 25 °C durante 5-7 días. Se consideró que en aquellos tubos donde se apreciaba turbidez existía presencia de bacterias lácticas (McFaddin, 1985). Su presencia fue confirmada mediante observación al microscopio.

2.3.4 Aislamiento y conservación de microorganismos

2.3.4.1 Aislamiento de mohos

Las colonias con aspecto mohoso aparecidas en el recuento de aerobios mesófilos y de mohos y levaduras se sembraron, con un asa de Kolle, por el método de los tres puntos equidistantes en una placa Petri conteniendo 15 ml de medio agar patata glucosada (PDA). La siembra se realizó manteniendo la placa invertida. Una vez sembradas, las placas se incubaron en posición invertida a 28-30 °C hasta la aparición de colonias bien formadas.

2.3.4.2 Aislamiento de bacterias y levaduras

De entre todas las colonias crecidas sobre los medios de recuento que no presentaban aspecto mohoso se seleccionaron al azar de 3 a 10 colonias por muestra. Estas colonias se resembraron por el método de la triple estría en placas Petri con medio PCA. Una vez sembradas se pusieron en incubación a 28-30 °C durante 24-72 horas.

2.3.4.3 Conservación de las cepas aisladas

Las cepas de mohos aisladas se resembraron en tubos de ensayo con medio PDA inclinado. Se incubaron a 28 - 30 °C hasta la aparición de colonias bien formadas y se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su posterior utilización.

Las bacterias aisladas se conservaron en medio PCA siguiendo el mismo procedimiento que con los mohos.

Las levaduras aisladas se conservaron en tubos de ensayo con medio agar extracto de malta (MEA) inclinado, por el procedimiento descrito para mohos y bacterias.

En todos los casos las cepas fueron resembradas cada dos meses aproximadamente.

2.3.5 Identificación de microorganismos

2.3.5.1 Identificación de mohos

El reconocimiento e identificación de los mohos se llevó a cabo por examen microscópico (x 400 aumentos) de sus estructuras reproductoras y del tipo de hifas, y teniendo en cuenta tanto las monografías generales (Barnett y Hunter, 1973) como las específicas para *Aspergillus* (Raper y Fenell, 1965), *Aspergillus flavus* (Christensen, 1981), *Penicillium* (Raper y Thom, 1949; Pitt, 1979) y *Fusarium* (Booth, 1977).

El método seguido fue el siguiente:

Se tomó un portaobjetos limpio y desengrasado, sobre el que se depositó una gota de agua destilada. Con una asa de Kolle se tomó, de la zona más externa del cultivo, una parte del micelio fúngico, procurando no romper la masa de hifas. El micelio se depositó seguidamente sobre la gota de agua. Se colocó un cubreobjetos sobre la preparación, evitando la formación de burbujas de aire, y se procedió a la observación microscópica.

Se llega a la identificación del género y especie basándose en los siguientes caracteres

morfológicos:

- 1.- Características de las hifas sumergidas: color, presencia o ausencia de septos, diámetro aproximado y caracteres distintivos de estructuras especiales si las hubiera.
- 2.- Grado de desarrollo de las estructuras de fructificación.
- 3.- Características y disposición de los órganos de fructificación.
- 4.- Color, tamaño y forma de los órganos de fructificación maduros.
- 5.- Detalles sobre la estructura de fructificación, incluyendo medición de las partes esenciales y disposición en ellas de las esporas.
- 6.- Detalles completos de las esporas, color, forma, tamaño, tabicación y marcas superficiales.

2.3.5.2 Identificación de bacterias

La primera prueba realizada, para cada una de las cepas aisladas, fue una tinción Gram (Harrigan y McCance, 1979) y su correspondiente observación al microscopio. Esto nos permitió separar las levaduras de las bacterias, y dentro de éstas la formación de tres grandes grupos: bacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos y cocos. En el caso de los bacilos Gram positivos se realizó, además, una tinción de esporas (Harrigan y McCance, 1979).

Las bacterias fueron identificadas siguiendo la metodología y criterios propuestos por Krieg y Holt (1984) y por Sneath *et al.* (1986), así como los de Hernandez y Dubon (1987).

Los **BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS** se asignaron directamente al género *Bacillus*, por ser el único género aerobio dentro de este grupo, y se dividieron en tres grupos atendiendo a la morfología de las esporas y a su capacidad o no de deformar la célula (Gordon *et al.*, 1973):

- Grupo 1: Esporas ovoideas no deformantes.
- Grupo 2: Esporas ovoideas deformantes.
- Grupo 3: Esporas esféricas deformantes.

En el **Grupo 1** (esporas ovoideas no deformantes) se realizaron las siguientes pruebas de identificación:

- **Crecimiento en anaerobiosis en caldo nutritivo**

A partir de un cultivo reciente (24 horas) de la cepa a identificar se sembraron tubos con caldo nutritivo. Se eliminó el oxígeno disuelto por enfriamiento brusco en baño a 0 °C. Para crear las condiciones de anaerobiosis se sellaron los tubos con aceite de vaselina puro y previamente esterilizado. Los tubos inoculados se incubaron en estufa a 28 °C durante 5 o más días hasta aparición o no de turbidez visible en el medio. Se consideraron positivos aquellos tubos en los que apareció turbidez en el medio.

- **Crecimiento con arabinosa como única fuente de carbono**

Se utilizó medio para crecimiento de arabinosa como única fuente de carbono. La siembra, incubación y lectura es similar a la descrita en la prueba de crecimiento en anaerobiosis, sin ser en este caso necesaria la eliminación del oxígeno disuelto en el medio.

- **Detección de movilidad de los microorganismos**

Esta característica se visualiza observando al microscopio (x400 aumentos) una tinción al fresco del cultivo problema, y viendo si los microorganismos son capaces de moverse por sí mismos.

- **Hidrólisis del almidón**

Se sembró el microorganismo en placa Petri con agar almidón mediante una estría diametral a la placa y se puso a incubar a 28 °C durante 2 a 14 días hasta buena formación de las colonias.

La lectura se realizó inundando la placa con lugol. Si no se produce hidrólisis, el almidón del medio se tiñe de azul. Las áreas de hidrólisis aparecen como zonas claras, consecuencia de la actividad β -amilásica, o bien como zonas de color marrón rojizo, consecuencia de la actividad α -amilásica.

- Utilización del citrato como única fuente de carbono

Se utilizaron tubos de ensayo con tapón de rosca conteniendo 9 ml de medio agar citrato de Simmons, esterilizado y solidificado en posición inclinada.

A partir de un cultivo reciente se realizó la siembra por una sola estría longitudinal. Los tubos inoculados se incubaron a 28 °C durante 7 días.

La lectura se realizó por constatación del cambio de color del medio de verde a azul oscuro.

- Crecimiento a pH 6,8

Se utilizó como medio caldo nutritivo ajustando el pH a 6,8 mediante la adición de 1 N HCl. Se repartió el medio en tubos de ensayo a razón de 9 ml por tubo. Se inocularon los tubos y se colocaron en estufa a 28 °C durante 4 días.

La lectura se realiza por observación de la aparición de turbidez. Dicha turbidez indica el crecimiento del microorganismo ensayado.

- Hidrólisis de la caseína

Se utilizó el medio agar leche, esterilizado y repartido en placas Petri. Se sembró el microorganismo por estría diametral. Se incubaron las placas en estufa a 28 °C durante 2 a 14 días, hasta crecimiento adecuado de las colonias.

La lectura se realiza inundando la placa con una disolución acuosa de ácido clorhídrico al 1 %. El ácido provoca la precipitación de las proteínas y la aparición de zonas menos opacas en el medio, que pueden identificarse como zonas en las que se ha producido la hidrólisis de la caseína.

- Prueba de la oxidasa

La prueba se realizó en agar nutritivo repartido en placas Petri. Se sembraron las placas por estría simple diametral y se incubaron a 28 °C hasta la adecuada formación de las colonias.

La lectura se realizó inundando las placas con una solución acuosa de clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamida al 1 %. Las colonias que dan una reacción positiva a la oxidasa adquieren un tono rosado, que en 10-30 minutos pasa a ser rojo oscuro, púrpura y negro.

- Prueba de Voges-Proskauer

Como medio para la realización de la prueba se utilizó caldo glucosa fosfato repartido en tubos a razón de 5 ml por tubo. Se sembraron los tubos y se pusieron a incubar a 28 °C durante 2 - 5 días.

La lectura se realizó tomando 1 ml del cultivo en un tubo de ensayo y añadiéndole el reactivo para Voges-Proskauer modificado según Barritt (1936), es decir, 0,5 ml de solución de alfa naftol al 6 % y 0,5 ml de hidróxido potásico al 16 %; si aparece una coloración roja, generalmente pasados unos 5 minutos, el cultivo se considera VP (Voges-Proskauer) positivo, es decir que posee la facultad de liberar acetilmetilcarbinol al medio, producido a partir de la glucosa. Si la prueba da resultado negativo a los 2 días se repite la misma operación a los 5 días antes de dar la prueba final como negativa.

En el **Grupo 2** (esporas ovoideas deformantes) se realizaron las siguientes pruebas de identificación:

- Crecimiento en anaerobiosis en caldo nutritivo

La prueba se realizó de la misma forma que para el grupo 1.

- Prueba de Voges-Proskauer

La prueba se realizó de la misma forma que para el grupo 1.

- Crecimiento con arabinosa como única fuente de carbono

La prueba se realizó de la misma forma que para el grupo 1.

- Hidrólisis de la gelatina

En la realización de esta prueba se utilizó el medio gelatina, repartido en tubos. Se inoculó con cultivos recientes de los microorganismos y se incubaron a 28 °C durante 9 días.

La lectura se realizó por inmersión de los tubos en un baño de agua helada hasta la formación de un gel debido a la presencia de gelatina. La reacción se consideró negativa en aquellos casos en los que se observó gelificación en toda la extensión del medio. Cuando la gelificación no se producía en todo el medio era indicador de que se había producido una cierta hidrólisis de la gelatina, siendo la prueba positiva. Esta prueba se realizó también en tubos que no fueron inoculados, para excluir la posibilidad de autólisis de la gelatina.

- Producción de anhídrido carbónico a partir de la glucosa

Se utilizó el medio de jugo de tomate semisólido de Gibson repartido en tubos a razón de 5 ml por tubo. Una vez solidificado el medio se inoculó por picadura, se selló con una capa de agar fundido y se puso a incubar en estufa a 28 °C durante 3 o más días.

La lectura se realizó verificando la aparición de burbujas de gas acumuladas bajo el sello de agar, que indican un crecimiento heterofermentativo del microorganismo con producción de gas a partir de la glucosa

- Hidrólisis de la caseína

La prueba se realizó de la misma forma que para el grupo 1.

- Crecimiento a pH 6,8

La prueba se realizó de la misma forma que para el grupo 1.

- Crecimiento con manitol como única fuente de carbono

Esta prueba se realizó de forma análoga a la prueba de crecimiento con arabinosa como única fuente de carbono, sustituyendo en la composición del medio, la arabinosa por manitol.

- Prueba de la catalasa

Se sembraron los microorganismos en agar nutritivo y se incubaron a 28 °C hasta buena formación de las colonias. La lectura se realizó vertiendo 1 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 10 volúmenes (3%) sobre el cultivo. La presencia de catalasa se manifiesta por la aparición de efervescencia producida por la liberación de oxígeno libre a partir del agua oxigenada.

- Crecimiento con un 2% de NaCl

Se utilizó como medio de cultivo caldo nutritivo suplementado con un 2% de cloruro sódico. La lectura se realiza de la misma forma que se explicó en el grupo 1 para la prueba crecimiento a pH 6,8.

- Crecimiento a 65 °C

Se utilizó caldo nutritivo repartido en tubos. Se inocularon los tubos y se pusieron a incubar a 65 °C durante 4 días. La lectura se realiza por observación de la aparición de turbidez. Dicha turbidez indica el crecimiento del microorganismo ensayado.

En el **Grupo 3** (esporas esféricas deformantes) se realizaron las siguientes pruebas identificativas:

- Crecimiento en anaerobiosis en caldo nutritivo

Ver pruebas realizadas para el grupo 1.

- Producción de ácidos a partir de glucosa

Se utilizó como medio de cultivo caldo glucosa fosfato repartido en tubos de ensayo a razón de 5 ml por tubo. Se inocularon los tubos y se incubaron en estufa a 28 °C durante 2-7 días.

La lectura se realizó vertiendo sobre el cultivo unas gotas de una solución de rojo de

metilo. La aparición de una coloración roja indicaba que la reacción era positiva, es decir que se habían formados ácidos a partir de la glucosa. En caso contrario la adición del reactivo provocaba una coloración amarillenta.

- Requerimientos de NaCl y KCl

Se utilizó el medio NaCl y KCl repartido en tubos. Se sembraron los tubos y se incubaron a 28 °C. La lectura de la prueba se realizó de forma análoga a la de la prueba del grupo 1 crecimiento a pH 6,8.

- Prueba de reducción de nitratos

Se utilizó agua de peptona nitrada repartido en tubos de ensayo provistos con campana Durham a razón de 5 ml por tubo. Se sembraron los tubos y se incubaron a 28 °C, junto con un tubo control, durante un período de 2 a 7 días.

Para la lectura se utilizó el reactivo de Griess-Ilosvay modificado (McLean y Henderson, 1966), que consta de dos soluciones. La lectura se realizó añadiendo a cada uno de los tubos 1 ml de cada una de las soluciones del reactivo. La presencia de nitritos (reacción positiva) se manifestó por la aparición de color rojo en pocos minutos; el tubo control debe presentar poca o ninguna coloración. Si el resultado era negativo, se confirmaba añadiendo un poco de polvo de zinc, que reduce a nitrito cualquier traza de nitrato. Si al añadir el zinc no se producía cambio de color, significaba que el cultivo había reducido los nitratos más allá del estado de nitrito. La presencia de gas en la campana Durham indicaba la formación de nitrógeno gaseoso.

Las bacterias con **FORMAS DE COCO** se identificaron también en base a pruebas bioquímicas:

- Prueba de la catalasa

Ver las pruebas realizadas para el Grupo 2 de bacilos Gram-positivos esporulados.

- Crecimiento en anaerobiosis en caldo nutritivo

Ver las pruebas realizadas para el Grupo 1 de bacilos Gram-positivos esporulados.

Las **BACTERIAS GRAM NEGATIVAS** se identificaron mediante sistema de identificación comerciales (Tira API 10S de Analytab Products y ENTEROTUBE II de Roche), que sistematizan gran número de pruebas bioquímicas y nutricionales.

2.3.5.3 Identificación de levaduras

Las cepas que se clasificaron como levaduras al realizar la observación microscópica de los aislamientos y se prepararon para su identificación sembrándolas por el método de la triple estría en placas de agar extracto de malta. Las placas sembradas se incubaron a 28 °C durante 24-72 horas hasta que se observó un desarrollo adecuado de las colonias.

Para la identificación de las levaduras a nivel de especie se siguió el método simplificado propuesto por Deak y Beuchat (1987) para levaduras que crecen en alimentos.

Según este método, en una primera fase, las levaduras a identificar se dividen en 16 subgrupos mediante la realización de las siguientes pruebas básicas o primarias:

Fermentación de la glucosa.

Asimilación de nitratos.

Asimilación de azúcares: rafinosa, maltosa, galactosa y celobiosa.

Reacción de la ureasa.

En algunos casos es posible llegar directamente a identificar la especie con las pruebas básicas. En otros casos, para completar la identificación de las especies, es necesario realizar una serie de pruebas adicionales que pueden llegar a ser, en el caso más desfavorable, hasta ocho. Estas pruebas son seleccionadas respectivamente para cada subgrupo, y pueden realizarse después de la lectura de las pruebas básicas. Las pruebas adicionales más

frecuentes son:

Asimilación de otros compuestos carbonados:

- Eritritol
- Manitol
- Melobiosa
- Sacarosa
- Trealosa
- Xilosa

Crecimiento a 37 °C.

Resistencia a la actidiona (cicloheximida).

Además, también se tienen en cuenta las características morfológicas macro y microscópicas.

- Preparación del inóculo

Antes de proceder a las pruebas identificativas, y con el fin de obtener cultivos en crecimiento activo, las cepas a identificar se sembraron en agar extracto de malta a 25-28 °C durante 2-3 días. Mediante la ayuda de un asa de Kolle, y siempre en condiciones asépticas, se preparó una solución concentrada de células en agua destilada estéril. Se determinó la concentración con cámara Thoma y se ajustó de forma que la concentración final fuese aproximadamente de 10^6 microorganismos/ml. Los medios utilizados en las pruebas posteriores se inocularon con 0,1 ml de estas suspensiones (van der Walt y Yarrow, 1984).

- Observación microscópica

Se prepararon portaobjetos estériles con una capa muy delgada de medio agar patata dextrosa, sembrándose, las levaduras, mediante una serie de estrías. A continuación, se colocó un cubreobjetos sobre parte del medio sembrado y se incubaron a 25 °C por un período de hasta 7 días. Finalmente, se observaron al microscopio estudiando la formación o no de hifas, la formación de esporas y el tipo de reproducción vegetativa.

- Fermentación de la glucosa

Se preparó caldo para fermentación de azúcares repartido en tubos de ensayo con campanas Durham, que se esterilizaron en autoclave y una vez fríos se añadió 1 ml de solución concentrada de glucosa, previamente esterilizada por filtración, de modo que la concentración de glucosa en el medio fuese del 2%. Se utilizaron tubos control, sin glucosa, ya que en algunos casos la trealosa contenida en el extracto de levadura puede dar lugar a una fermentación detectable con las levaduras que fermentan esta sustancia (Jones, 1975). Los tubos se incubaron a 25-28 °C y se examinaron diariamente, para observar la producción de gas, durante 10 días.

- Asimilación de nitratos

Se preparó un medio concentrado 10 veces, disolviendo 11,7 g de Yeast carbon base (Difco) y 0,78 g de nitrato potásico en 100 ml de agua destilada (van der Walt y Yarrow, 1984). Se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigerador hasta su utilización. El medio final se preparó añadiendo 0,5 ml del medio concentrado a 4,5 ml de agua destilada estéril. Se prepararon tubos en blanco, sin nitrato potásico. Se inocularon los tubos y se incubaron a 25-28 °C durante una semana.

- Asimilación de compuestos carbonados

Se observó la capacidad de crecer en presencia de galactosa, maltosa, celobiosa, rafinosa, sacarosa, melobiosa, eritritol, D-manitol, trealosa y D-xilosa a una concentración de 0,5 % como única fuente de carbono.

Se preparó un medio concentrado 10 veces, disolviendo 6,7 g de Yeast nitrogen base (Difco) y la cantidad adecuada del compuesto carbonado equivalente a 5 g de glucosa en 100 ml de agua destilada (van der Walt y Yarrow, 1984). Se esterilizó por filtración y se guardó

en refrigerador hasta su utilización. El medio final se preparó pipeteando 0,5 ml del medio concentrado en tubos de ensayo conteniendo 4,5 ml de agua destilada estéril. También se prepararon tubos control sin compuesto carbonado. Se inocularon y se incubaron a 25-28 °C durante 3 semanas.

- Reacción de la ureasa

Para la realización de esta prueba se utilizó el medio agar urea de Christensen con un pH inicial de 6,8. Una vez preparados los tubos con el medio inclinado se sembraron los tubos y se incuban a 25-28 °C durante 1 a 7 días. Si la prueba es positiva el medio pasa de color rojo a amarillo debido a un aumento del pH del medio por efecto de la formación de amoníaco a partir de la urea. Para cada cepa se sembraron tubos control, con medio base sin urea, para comprobar que el amoníaco se produce a partir de la urea y no de la peptona del medio.

- Crecimiento a 37 °C

Las distintas cepas se sembraron en tubos inclinados con agar extracto de malta y se incubaron a 37 °C durante 2 a 4 días. En los casos de crecimiento débil se volvió a repetir la prueba a partir del subcultivo crecido a 37 °C (Kreger-van Rij, 1964).

- Resistencia a la cicloheximida (actidiona)

Se probó la resistencia de las levaduras a bajas concentraciones de cicloheximida (100 y 1000 ppm). Para ello se preparó medio base concentrado 10 veces, disolviendo 0,1 g o 1 g de cicloheximida, según la concentración deseada, en 2,5 ml de acetona. La solución de acetona se añadió a una solución de 6,7 g de Yeast nitrogen base y 10 g de glucosa en 100 ml de agua destilada y se esterilizó por filtración. El medio final se obtuvo pipeteando 0,5 ml del medio base concentrado en tubos con 4,5 ml de agua destilada estéril. Se inocularon los tubos y se incubaron a 25-28 °C durante tres semanas.

2.3.6 Determinación del carácter potencialmente alterante de los microorganismos aislados

Una vez seleccionados los microorganismos capaces de desarrollarse en cremogenado de melocotón, se realizaron pruebas confirmativas de su capacidad para alterar dicho producto. Para ello, se prepararon suspensiones de 10^6 microorganismos/ml (contadas mediante cámara Thoma) de cada una de las cepas de los microorganismos a estudiar. Paralelamente, se prepararon tubos de ensayo con tapón de rosca estanco con 9 ml de cremogenado de melocotón estéril. Para cada una de las cepas se inocularon 4 tubos de cremogenado con 1 ml de suspensión del microorganismo correspondiente. Una vez inoculados se añadieron 2 ml de aceite de vaselina estéril con el fin de conseguir unas condiciones de atmósfera baja en oxígeno. Dos de los tubos inoculados se incubaron a 2 °C y los otros dos a 28 °C durante 45 días. Se realizaron controles cada 5 días con el fin de detectar la presencia de gas a presión en los tubos, la aparición de burbujas en el seno del cremogenado y/o la separación de la fase líquida que confirman la capacidad de la cepa estudiada para fermentar y alterar el cremogenado de melocotón.

2.3.7 Seguimiento del comportamiento de las levaduras durante el almacenamiento del cremogenado de melocotón

2.3.7.1 Microorganismos

Para el estudio del comportamiento de las levaduras durante el almacenamiento en cremogenado de melocotón se utilizaron tres cepas de levaduras (26, 99 y 204) de las aisladas a partir del cremogenado de melocotón.

2.3.7.2 Cultivo de las levaduras y preparación de los inóculos

La propagación de las cepas de levaduras se realizó por siembra superficial en placas Petri con medio agar extracto de malta. Las placas se incubaron en estufa a 28 °C durante 48-72 horas, hasta que se observó un desarrollo adecuado de las colonias. A partir de las colonias crecidas se prepararon suspensiones de levaduras en agua destilada estéril. Con la ayuda de una cámara Thoma se determinó la concentración de las suspensiones preparadas. Finalmente, una vez conocida la concentración de la suspensión se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener la concentración de inóculo deseada.

2.3.7.3 Diseño de la experiencia

El cremogenado de melocotón se colocó en recipientes de vidrio, con cierre hermético del tipo "twist-off", de 2 litros de capacidad. Se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Una vez esterilizados se añadió a cada uno de los botes la cantidad necesaria de las suspensiones de levaduras para alcanzar las concentraciones de inóculo a ensayar (0, 10 y 1000 microorganismos/ml) y se pusieron a incubar a las temperaturas de 5 y 15 °C.

Para todos los recipientes se realizaron muestreos diarios durante la primera semana de incubación, luego los muestreos se hicieron semanalmente hasta los 140 días que duró el periodo total de incubación.

En la tabla siguiente se resume de forma simplificada los factores estudiados para cada una de las tres cepas de levaduras estudiadas:

Temperatura de incubación (°C)	Concentración inicial de inóculo (microorganismos/ml)	Periodo de incubación (días)
5	0	140
	10	140
	1000	140
15	0	140
	10	140
	1000	140

Tabla 4-2

Para cada una de las muestras tomadas se realizó el correspondiente recuento de levaduras, así como la determinación de los °Brix y del pH del medio.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.7.4 Recuentos de levaduras

Para evaluar el crecimiento de las levaduras en cremogenado de melocotón se realizaron recuentos de viables. Para ello se procedió, siempre en condiciones asépticas, a la toma de muestras de cada uno de los recipientes. Cuando tuvo lugar la fermentación del cremogenado por las levaduras, fue preciso eliminar todo el gas contenido en las muestra mediante agitación, ya que este gas producía grandes errores a la hora de determinar el volumen muestreado. Se preparó un banco de diluciones decimales a partir del cremogenado. Se colocó 1 ml de cada una de las diluciones correspondientes en una placa Petri y a continuación se vertieron en cada placa 15 ml de medio agar extracto de malta, previamente esterilizado y que se mantuvo fundido a 45-48 °C. Se mezcló por agitación suave y se dejó

solidificar el medio. Una vez solidificado el medio, las placas se ponen a incubar, en posición invertida, a 28 °C durante 48-72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se recontaron aquellas placas donde el número de colonias crecidas se hallaba entre 30 y 300 colonias. Multiplicando el número de colonias formadas por el factor de dilución correspondiente a cada placa se obtuvo el número de partículas formadoras de colonias por mililitro (pfc/ml).

2.3.7.5 Determinación de los °Brix y pH del medio

El contenido de azúcares del medio se determinó en función de los °Brix, que representan el de sólidos solubles de una disolución expresado en peso de sacarosa por 100 g de solución a 20 °C. Para ello se utilizó un refractómetro Atago RX-1000.

El pH del medio se determinó por medida potenciométrica con un pH-metro Crison Micro pH-2001.

2.3.7.6 Cinéticas de crecimiento microbiano

Los parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento microbiano fueron estimados ajustando los datos experimentales de los recuentos de las levaduras a la ecuación de Gompertz mediante análisis de regresión no lineal empleando el programa Statgrafics (Statistical Graphics Corporation). Tanto los ajustes como los estimados fueron significativos con un nivel de confianza del 95%.

A partir de los valores de la ecuación de Gompertz, se calculó la fase de latencia (FL), el ratio de crecimiento exponencial (CE), el tiempo de generación (TG) y la densidad máxima de población (DMP) según describen Gibson *et al.* (1987).

2.3.8 Estudio de la termorresistencia de las levaduras

2.3.8.1 Microorganismos

Para el estudio de la termorresistencia se utilizaron tres cepas de levaduras (26, 99 y 204) de las aisladas a partir del cremogenado de melocotón.

2.3.8.2 Preparación de la suspensión de levaduras

Las cepas de levaduras se replicaron en placas Petri por siembra superficial en medio agar extracto de malta. Después de 48-72 horas de incubación a 28 °C las levaduras se arrastran con agua de peptona tamponada estéril. La suspensión de levaduras se mantuvo en la nevera a 4 °C durante 3-4 días antes de realizar los tratamientos térmicos con el objeto de conseguir una solución de levaduras con una fase de crecimiento uniforme. La concentración de la suspensión de trabajo fue del orden de 10^6 microorganismos/ml, ajustada mediante cámara Thoma.

2.3.8.3 Medios y condiciones de los tratamiento térmicos

Para las tres cepas se determinó su termorresistencia en cremogenado de melocotón (pH 3,9) y en tampones McIlvaine de pH 4 y 7, preparados según describe Dawson *et al.* (1969). El rango de temperaturas de trabajo fue de 56 °C a 64 °C.

2.3.8.4 Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos se realizaron con un termorresistómetro TR-SC (Pat. 87.00948) del Departamento de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (Condón *et al.*, 1989).

La metodología de trabajo seguida fue la siguiente:

- Se llenó el vaso principal con 350 ml del medio de tratamiento, en el cual se quería determinar la termorresistencia. Se presurizó la cámara de tratamiento con nitrógeno hasta 2 kg/cm² para facilitar la posterior extracción de las muestras.

- Se procedió a la esterilización de la cámara junto con el medio de tratamiento mediante calentamiento, con agitación constante, a 120 °C durante 20 minutos.

- Manteniendo la agitación (1500-2000 rpm) se procedió a seleccionar la temperatura de tratamiento correspondiente.

- Una vez estabilizada la temperatura, se inyectaron 0,2 ml de la suspensión de la levadura cuya termorresistencia que pretendía estudiar.

- A intervalos de tiempo predeterminados se extrajeron, mediante una válvula solenoide, 0,1 ml de muestra del vaso de tratamiento.

2.3.8.5 Recuento de microorganismos supervivientes

El recuento de microorganismos supervivientes o viables se realizó por el método que a continuación se expone. Las muestras extraídas del termorresistómetro se tomaron directamente, sin realizar ninguna dilución, en tubos de ensayo con 15 ml de medio agar Sabouraud previamente fundido y mantenido a 45 °C. Seguidamente se vertió el contenido del tubo sobre placas Petri estériles. Una vez solidificado el medio se pusieron a incubar en posición invertida en una estufa de cultivo a 28 °C durante 24-48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de las colonias crecidas en las placas con un contador de colonias digital Ams Protos, el cual, gracias a una serie de objetivos fotográficos, permite la lectura de recuentos de hasta 20.000 colonias por placa sin que se produzcan errores significativos.

2.3.8.6 Cálculo de los valores D_t y z

Representando el logaritmo del número de microorganismos supervivientes frente al tiempo de tratamiento, se obtuvieron las curvas de supervivencia. A partir de estas gráficas, mediante regresión lineal, se determinaron los tiempos de reducción decimal (D_t). Estos cálculos se realizaron teniendo en cuenta los valores del tramo recto de las curvas de supervivencia y solamente se consideraron aquellas curvas con más de tres valores en el tramo recto y con un coeficiente de correlación (r) mayor que 0,940. Las curvas de supervivencia con un tramo recto que incluía menos de un ciclo logarítmico fueron rechazadas.

Los valores de z fueron calculados por regresión lineal a partir de los valores de $\log D_t$ frente a sus correspondientes temperaturas de tratamiento térmico.

Los coeficientes de correlación y la comparación de las pendientes de las curvas de tiempos de reducción decimal fueron calculados según describen Steel y Torrie (1960). Todos los cálculos estadísticos se realizaron en ordenador con la ayuda del programa estadístico Statgrafics (Statistical Graphics Corporation).

3 Pardeamiento no enzimático

3.1 Preparación de las muestras

Para estudiar el pardeamiento no enzimático en el cremogenado de melocotón se utilizaron muestras con cuatro concentraciones de sólidos solubles diferentes: 11, 20, 30 y 40 °Brix. Debido a las grandes cantidades de muestras necesarias para realizar los experimentos y a la dificultad de obtener muestras de cremogenado de concentraciones tan elevadas sin que sufrieran un severo pardeamiento durante el proceso de concentración, se optó por obtener las muestras de cremogenado concentrado (20, 30 y 40 °Brix) mediante una mezcla del cremogenado inicial (11 °Brix) con las proporciones adecuadas de su fracción líquida concentrada (zumo concentrado de melocotón de 70 °Brix), suministrados, ambos, por una industria local.

3.2 Tratamiento térmico

Para realizar el tratamiento térmico el cremogenado de melocotón se colocó en botes de vidrio de 3 cm de diámetro y 12 cm de altura de cierre hermético, y completamente llenos, a fin de evitar espacios de cabeza con aire que pudiera afectar a la pulpa y provocar reacciones de oxidación que enmascarasen la verdadera cinética de pardeamiento no enzimático por efecto del calor.

Las temperaturas de trabajo aplicadas para el tratamiento térmico fueron de 80, 85, 90, 95 y 98 °C. La duración del tratamiento estuvo en función de su temperatura: a menor temperatura mayor duración del tratamiento. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes:

Temperatura de 80 y 85 °C: 0, 30, 60, 120, 210, 300, 390 y 480 minutos.

Temperatura de 90, 95 y 98 °C: 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360.

Para cada temperatura y concentración se prepararon 24 botes con las muestras de cremogenado. Tres de ellos no sufrieron ningún tipo de tratamiento térmico (muestras estándar), y el resto fueron introducidos en un baño termostatzado (P>Selecta Digiterm) donde fueron sometidos al tratamiento térmico a la temperatura correspondiente. A cada tiempo de muestreo se extrajeron 3 botes del baño y se introdujeron en un baño de hielo fundente con el fin de enfriarlos rápidamente y, de este modo, detener la reacción de pardeamiento no enzimático.

3.3 Medida del color

Una vez enfriadas las muestras se procedió a realizar las lecturas de reflectancia en un espectrofotocolorímetro Macbeth Color-Eye 3000. Para ello se utilizaron tubos de vidrio de calidad óptica de 2 cm de diámetro y 9 cm de altura. Los tubos se colocaron en un acoplamiento exterior al equipo de medida coincidente con la ventana de lectura, de 4,9 cm² de área.

Para determinar los espectros de transmitancia, las muestras de cremogenado tuvieron que ser previamente clarificadas. Para ello se tomaron 100 g de la muestra y se les añadió 10 g de solución de bentonita, mezclando adecuadamente. La mezcla se centrifugó durante 20-25 minutos a una velocidad de 10.000 rpm a 4 °C en una centrifuga Beckman J2-21. Se recogió el sobrenadante resultante y se rediluyó a 10°Brix, para filtrarlo posteriormente con filtros Millipore MSI de 0,45 m de poro y 2,5 cm de diámetro. A continuación se realizaron las determinaciones de la transmitancia de las muestras del filtrado obtenido (fracción líquida del cremogenado). Se utilizó el mismo equipo que para la reflectancia utilizando cubetas de 1

cm de paso.

Los espectros de reflectancia y de transmitancia se obtuvieron en el rango de longitudes de onda de 360 a 740 nm, con un intervalo de 20 nm. A partir de estos espectros, y mediante el programa Macbeth Optiview, se obtuvieron la absorbancia a 420 nm (A_{420}), de la fracción líquida del cremogenado, y los valores de las coordenadas de color CIELAB (L^* , a^* , b^*) para el iluminante D_{75} y el observador 10° , del cremogenado de melocotón. También, se obtuvieron los valores triestímulo X, Y y Z para el iluminante C y el observador 2° , que se utilizaron para determinar el índice de pardeamiento de Buera.

3.4 Determinación de 5-hidroximetilfurfural y de azúcares

La determinación de HMF y de azúcares se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los azúcares analizados fueron sacarosa, fructosa y glucosa.

La preparación de las muestras para su análisis cromatográfico se realizó del mismo modo que el descrito en el apartado anterior para la determinación de la transmitancia. Todos los eluyentes se filtraron con filtro de 0,45 μ m de poro y se desgasificaron antes de su uso.

3.4.1 5-hidroximetilfurfural

Para la determinación del HMF se utilizó un cromatógrafo Waters 600 Controller equipado con un integrador Waters 476 Data Module y un detector de absorbancia Waters 486 Tunable Absorbance a una longitud de onda de 254 nm.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Columna: Se utilizó una columna amino Spherisorb S5 NH_2 (Tracer Analítica) de fase ligada NH_2 de tamaño de partícula 5 μ m de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno.

Fase móvil: Tampón fosfato:acetonitrilo, en relación volumétrica 80:20. El tampón fosfato se preparó diluyendo 0,68 g de $K_2 HPO_4$ en un litro de agua bidestilada y ajustando con ácido ortofosfórico hasta pH 3,6.

Flujo: 1 ml/min.

Temperatura de trabajo: ambiente.

El método de cuantificación empleado fue el de patrón externo. Se construyó una curva patrón inyectando distintas diluciones de HMF de concentración conocida. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre la concentración de HMF, expresada en ppm, y el área representada por el integrador:

$$HMF = 1,65 + 1,0710^5 \text{ Área} \quad r^2 = 0,999.$$

La concentración de HMF de todas las muestras analizadas estuvo dentro del rango de las concentraciones patrón. El tiempo de retención para el HMF en las condiciones señaladas fue de 3,18 minutos.

3.4.2 Azúcares

Para la determinación de los azúcares se utilizó un cromatógrafo Waters 600 Controller equipado con un integrador Waters 476 Data Module y un detector de índice de refracción Waters 410 Diferencial Refractometer.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Columna: Se utilizó una columna amino Spherisorb S5 NH_2 (Tracer Analítica) de

fase ligada NH₂ de tamaño de partícula 5 m de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno.

Fase móvil: Acetonitrilo:Agua en proporción volumétrica 80:20.

Flujo: 1 ml/min.

Temperatura de trabajo: ambiente.

El método de cuantificación empleado fue el de patrón externo. Se construyó una curva patrón para cada uno de los tres azúcares, inyectando distintas diluciones, de concentración conocida, del azúcar correspondiente. Se obtuvieron las siguientes relaciones lineales entre la concentración del correspondiente azúcar, expresada en ppm, y el área representada por el integrador:

$$\begin{array}{ll} \text{Sacarosa} = 0,0822 + 2,0710^8 \text{ Área} & r^2 = 0,999 \\ \text{Glucosa} = 0,0136 + 2,9110^8 \text{ Área} & r^2 = 0,999 \\ \text{Fructosa} = 0,0543 + 3,5110^8 \text{ Área} & r^2 = 0,999 \end{array}$$

La concentración de los distintos azúcares de todas las muestras analizadas estuvo dentro del rango de las concentraciones patrón. Los tiempos de retención en las condiciones señaladas fueron los siguientes:

Sacarosa: 12,99 minutos.

Glucosa: 9,05 minutos.

Fructosa: 8,07 minutos.

3.5 Procesado de datos

Para el estudio del pardeamiento no enzimático se evaluó la evolución durante el tratamiento térmico de los parámetros colorimétricos (A_{420} de la fracción líquida del cremogenado, coordenadas CIELAB y sus parámetros complementarios ΔE^* y ΔC^*), del HMF y de los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa).

Los valores experimentales obtenidos para los distintos parámetros mencionados se ajustaron, con ayuda del programa Statgraphics v.5.0, a diferentes modelos cinéticos con la finalidad de determinar aquellos que mejor describen el pardeamiento no enzimático. Para la cuantificación del efecto de la temperatura se realizaron ajustes a la ecuación de Arrhenius. En todos los casos se trabajó con un nivel de confianza del 95 %.

V Resultados y discusión

1 Caracterización físico-química del cremogenado de melocotón

Los resultados obtenidos de los distintos análisis que se han realizado para la caracterización del cremogenado de melocotón se relacionan en la Tabla 5-1.

Determinaciones físico-químicas	Cremogenado de melocotón
pH	3,8
Contenido en sólidos solubles (°Brix)	11,1
Acidez total (g de ác. cítrico/100 ml)	0,515
Actividad de agua	0,988
Sacarosa (%)	6,9
Glucosa (%)	0,91
Fructosa (%)	1,05
Índice de formol (ml hidróxido de sodio 0,1N/100 ml)	5,2
Nitrógeno total (mg nitrógeno/100 ml)	86,45
Contenido en pulpa (% en peso)	32
Substancias Pécicas (g ác. galacturónico/100 ml):	
Pectinas solubles en agua	0,896
Pectinas solubles en oxalato	0,093
Protopectinas	0,149
Fibra (% en peso)	1,5
HMF (ppm)	85

Caracterización físico-química del cremogenado de melocotón.

La mayoría de los valores que se han obtenido son de un orden similar a los que se citan en la bibliografía por otros autores (Casas, 1979; Belitz y Grosch, 1985) para melocotón.

2 Comportamiento reológico del cremogenado de melocotón

Al representar gráficamente los datos experimentales del esfuerzo cortante en función de la velocidad de deformación obtenidos en el cremogenado de melocotón para cada una de las cinco concentraciones estudiadas (Ver las siguientes figuras), se observa que los reogramas trazados presentan una forma similar a la de los fluidos pseudoplásticos, es decir, el esfuerzo cortante aumenta potencialmente con la velocidad de deformación.

[Figura 5-1](#)

[Figura 5-2](#)

[Figura 5-3](#)

[Figura 5-4](#)

[Figura 5-5](#)

Al estudiar los distintos reogramas, correspondientes cada uno de ellos a una concentración o contenido en sólidos solubles determinado, se observa claramente cómo, para las distintas temperaturas ensayadas, los valores que alcanza el esfuerzo cortante se hacen mayores a medida que aumenta la velocidad de deformación. Del mismo modo, resulta fácil apreciar que, para una velocidad de deformación fija, el esfuerzo cortante disminuye, en

todos los casos, al aumentar la temperatura. Al comparar los distintos reogramas correspondientes a las distintas concentraciones resulta evidente que, para una misma temperatura y velocidad de deformación, el esfuerzo cortante toma valores más altos al aumentar la concentración de sólidos solubles. Así, por ejemplo, para una temperatura de 5 °C y una velocidad de deformación de 2770 s⁻¹ el esfuerzo cortante en las muestras de cremogenado de melocotón de 11 °Brix ha sido de 70 Pa, mientras que en las muestras de 19,5 °Brix ha sido de 138 Pa y cuando el contenido en sólidos solubles de las muestras se incrementa hasta 29 °Brix el esfuerzo cortante llega a alcanzar 1045 Pa, es decir, que un incremento en el contenido en sólidos solubles de menos de tres 3 veces, provoca un aumento del esfuerzo cortante de casi 15 veces.

Los resultados experimentales del esfuerzo cortante y de la velocidad de deformación, para las muestras con diferentes contenidos en sólidos solubles y para cada una de las temperaturas ensayadas, se han ajustado, por el método de los mínimos cuadrados, a la forma no linealizada del modelo de Ostwald-de Waale o ley de la potencia:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (81)$$

Se han ensayado otros modelos diferentes al anterior propuestos por algunos autores como modelos adecuados para productos derivados de frutas (modelo de Herschel y Bulkley), pero los resultados obtenidos no han sido significativos, por lo que se han omitido en el presente trabajo.

En la Tabla 5-2 se relacionan los valores de los parámetros obtenidos para las distintas concentraciones y temperaturas experimentadas.

C (°Brix)	T (°C)	K (Pa.s ⁿ)	n	r ²
11	5	7,61 0,09	0,28 ± 0,03	0,990
	10	7,12 0,09	0,28 ± 0,03	0,994
	15	7,09 0,07	0,28 ± 0,03	0,993
	25	5,91 0,05	0,29 ± 0,04	0,995
	35	5,54 0,09	0,28 ± 0,03	0,996
	45	4,59 0,05	0,30 ± 0,08	0,998
	55	4,90 0,03	0,28 ± 0,05	0,991
	60	3,91 0,07	0,30 ± 0,03	0,995
14	5	9,60 ± 0,12	0,26 ± 0,03	0,992
	10	8,33 ± 0,16	0,27 ± 0,03	0,996
	15	7,36 ± 0,09	0,27 ± 0,05	0,997
	25	7,58 ± 0,23	0,26 ± 0,03	0,994
	35	6,39 ± 0,04	0,27 ± 0,06	0,996
	45	5,03 ± 0,07	0,29 ± 0,04	0,999
	55	4,45 ± 0,09	0,30 ± 0,03	0,998
	60	5,13 ± 0,21	0,29 ± 0,04	0,995
19,5	5	17,62 ± 0,08	0,26 ± 0,07	0,991
	10	20,08 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,989
	15	19,01 ± 0,14	0,23 ± 0,05	0,990
	25	17,06 ± 0,08	0,24 ± 0,04	0,998
	35	13,51 ± 0,05	0,26 ± 0,06	0,999
	45	11,73 ± 0,09	0,28 ± 0,04	0,999
	55	9,56 ± 0,18	0,29 ± 0,04	0,999
	60	8,93 ± 0,24	0,29 ± 0,07	0,977
24	5	40,21 ± 0,18	0,22 ± 0,009	0,999
	10	31,80 ± 0,08	0,26 ± 0,04	0,996
	15	33,83 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,999
	25	27,33 ± 0,03	0,28 ± 0,07	0,997
	35	23,72 ± 0,02	0,29 ± 0,08	0,998
	45	16,66 ± 0,09	0,34 ± 0,06	0,990
	55	17,22 ± 0,19	0,32 ± 0,04	0,999
	60	14,06 ± 0,05	0,35 ± 0,08	0,997
29	5	82,36 ± 0,21	0,32 ± 0,03	0,997
	10	78,78 ± 0,12	0,33 ± 0,07	0,999
	15	67,20 ± 0,18	0,34 ± 0,04	0,999
	25	54,63 ± 0,22	0,35 ± 0,05	0,999
	35	47,99 ± 0,09	0,36 ± 0,07	0,999
	45	40,36 ± 0,06	0,37 ± 0,09	0,999
	55	34,63 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,999
	60	32,12 ± 0,13	0,38 ± 0,08	0,999

Valores de las constantes de la ley de la potencia ($\tau = K\gamma^n$) para de cremogenado de melocotón a distintas concentraciones y temperaturas.

Para calcular la velocidad de deformación de las muestras estudiadas se ha utilizado la fórmula dada por el fabricante del viscosímetro (Haake). Según Barbosa-Cánovas y Peleg (1982), estas fórmulas dadas por los fabricantes de viscosímetros se basan en un supuesto comportamiento newtoniano del fluido estudiado. Ahora bien cuando el fluido estudiado tiene un comportamiento pseudoplástico el error que se desprende del uso de las anteriores fórmulas dependerá, sobre todo, de la desviación respecto del comportamiento newtoniano y del volumen que ocupe la muestra de líquido dentro de los vasos concéntricos. Una manera de minimizar este error es trabajar con un volumen pequeño de muestra. La relación de los radios de los vasos exterior e interior del equipo utilizado en esta investigación ha sido de 1,02, una de las más pequeñas en este tipo de aparatos.

[Tabla 5-2](#)

También se pueden realizar correcciones matemáticas de los datos experimentales. De entre los varios métodos que existen, uno de los más utilizados, es el propuesto por Brodkey (1967), que relaciona la velocidad de deformación real, $\dot{\gamma}_{real}$, y la velocidad de deformación newtoniana $\dot{\gamma}_{newtoniana}$, según la expresión:

$$\dot{\gamma}_{real} = \frac{\left(\frac{r_1}{r_2} \right)^2}{1 - \left(\frac{r_1}{r_2} \right)^2} \dot{\gamma}_{newtoniana} \quad (82)$$

$$\left[\left(\frac{r_1}{r_2} \right)^{2/n} \right]$$

$$n \left[1 - \left(\frac{r_1}{r_2} \right)^2 \right]$$

$$\left[\left(\frac{r_1}{r_2} \right)^2 \right]$$

siendo: r_1 y r_2 los radios interior y exterior respectivamente, y n el índice de comportamiento al flujo.

En la tabla siguiente se muestran los valores de los parámetros de la ley de la potencia corregidos según la expresión propuesta por Brodkey.

C (°Brix)	T (°C)	K (Pa.s ⁿ)	n	r ²
11	5	7,50 0,09	0,28 0,03	0,989
	10	7,02 0,09	0,28 0,03	0,994
	15	6,99 0,07	0,27 0,03	0,993
	25	5,82 0,05	0,28 0,04	0,995
	35	5,82 0,09	0,28 0,03	0,995
	45	4,52 0,05	0,29 0,08	0,998
	55	4,83 0,03	0,27 0,05	0,991
	60	3,86 0,07	0,30 0,03	0,995
14	5	9,47 0,12	0,26 0,03	0,992
	10	8,22 0,16	0,27 0,03	0,996
	15	7,25 0,09	0,27 0,05	0,997
	25	7,47 0,23	0,26 0,03	0,994
	35	6,29 0,04	0,27 0,06	0,996
	45	4,96,0,07	0,29 0,04	0,998
	55	4,39 0,09	0,30 0,03	0,998
	60	5,06 0,21	0,29 0,04	0,995
19,5	5	17,36 0,08	0,26 0,07	0,991
	10	19,79 0,05	0,23 0,03	0,989
	15	18,73 0,14	0,23 0,05	0,990
	25	16,81 0,08	0,24 0,04	0,998
	35	13,31 0,05	0,26 0,06	0,999
	45	11,57 0,09	0,27 0,04	0,999
	55	9,42 0,18	0,29 0,04	0,999
	60	8,80 0,24	0,29 0,07	0,977
24	5	39,60 0,18	0,223 0,009	0,999
	10	31,33 0,08	0,25 0,04	0,996
	15	33,33 0,05	0,24 0,03	0,999
	25	26,94 0,03	0,27 0,07	0,997
	35	23,38 0,02	0,28 0,08	0,999
	45	16,44 0,09	0,34 0,06	0,990
	55	16,99 0,19	0,32 0,04	0,999
	60	13,87 0,05	0,34 0,08	0,998
29	5	76,91 0,21	0,31 0,03	0,996
	10	67,36 0,12	0,33 0,07	0,999
	15	62,33 0,18	0,33 0,04	0,999
	25	50,54 0,22	0,35 0,05	0,999
	35	44,68 0,09	0,35 0,07	0,999
	45	37,51 0,06	0,37 0,09	0,999
	55	32,22 0,05	0,37 0,06	0,999
	60	29,86 0,13	0,38 0,08	0,999

Valores de las constantes de la ley de la potencia ($\tau = K \dot{\gamma}^n$) para cremogenado de melocotón a distintas concentraciones y temperaturas corregidos por el método de Brodkey.

Comparando los datos de la [Tabla 5-2](#) con los de la [Tabla 5-3](#) es posible comprobar que existen ciertas variaciones en los valores de K y n, aunque es preciso matizar que esas variaciones han sido muy pequeñas y para el índice de comportamiento al flujo, no han resultado nunca superiores a 0,01.

En todos los casos tanto los ajustes como los estimados de los parámetros K, índice de consistencia, y n, índice de comportamiento al flujo, resultaron significativos en un nivel de confianza del 95%.

Según se desprende del análisis de los resultados obtenidos para el coeficiente de determinación, r^2 (todos han resultado superiores a 0,990 y muchos de ellos del orden de 0,999) el modelo de Ostwald-de Waale o ley de la potencia describe adecuadamente el comportamiento al flujo del cremogenado de melocotón, por lo que, desde el punto de vista práctico, el flujo de este producto puede considerarse como pseudoplástico. Este mismo modelo ha sido utilizado con éxito por diversos autores para describir el comportamiento al flujo de diversos cremogenados o purés de fruta como en puré de guayaba (Vitali y Rao, 1982), en pulpas concentradas de naranja, (Vitali y Rao, 1984), en puré de albaricoque (Illicali, 1985; Steffe y Ford, 1985), en puré de manzana (Illicali, 1985; Gherardi *et al.*, 1985; Rao *et al.*, 1986), en zumo de limón no clarificado (Sáenz y Costell, 1986), en puré de mango (Gunjal y Waghmare, 1987), en puré de ciruela y melocotón (Ibarz y Lozano, 1992).

Al analizar la [Tabla 5-3](#) con los valores corregidos se observa que, de forma general, para una misma concentración, el incremento de la temperatura da lugar, en todas las muestras, a una disminución del índice de consistencia. Así, para las muestras con una concentración de 11 °Brix, el índice de consistencia disminuye desde 7,5 Pa.sⁿ, para una temperatura de 5 °C, hasta 3,86 Pa.sⁿ a 60 °C. Del mismo modo, cuando la concentración de las muestras es de 29 °Brix el índice de consistencia disminuye desde 76,91 para 5 °C hasta 29,86 para 60 °C. Por otro lado, para una misma temperatura, al aumentar el contenido en sólidos solubles también aumenta el índice de consistencia. Si se toma como ejemplo la temperatura de 5 °C se aprecia cómo el índice de consistencia aumenta de forma progresiva con el contenido en sólidos solubles, llegando a ser hasta diez veces mayores los valores obtenidos para las muestras de 29 °Brix (76,91 Pa.sⁿ) que los de las muestras con 11 °Brix (7,50 Pa.sⁿ). Comportamientos similares han sido observados por otros autores en purés y zumos de fruta (Saravacos, 1968; Vitali *et al.*, 1974; Ibarz *et al.*, 1992).

En el caso de las muestras de cremogenado de melocotón estudiadas se observa que el índice de comportamiento al flujo aumenta muy ligeramente al incrementarse la concentración, pasando de valores de 0,28-0,30 para las muestras de 11 °Brix a valores de 0,31-0,38 para las de 29 °Brix. Sin embargo, para una misma concentración, la temperatura apenas afecta al índice de comportamiento al flujo, permaneciendo prácticamente constante en el rango de temperaturas estudiado. Resultados muy similares obtuvo Watson (1968) para puré de melocotón de 15,4-24,9 °Brix y entre 4,5-60 °C, con un valor medio para el índice de comportamiento al flujo de 0,36.

El valor del índice de comportamiento al flujo indica el grado de pseudoplasticidad de un fluido, (García y Burón, 1980) de forma que cuanto más alejado se encuentra de la unidad (fluidos newtonianos) mayor pseudoplasticidad presenta el producto. Los bajos valores obtenidos para éste parámetro confirman el carácter claramente pseudoplástico del cremogenado de melocotón.

Por tratarse de un fluido pseudoplástico que sigue la ley de la potencia la viscosidad variará en función de la velocidad de deformación. Con objeto de analizar el comportamiento de la viscosidad aparente en cremogenado de melocotón se ha calculado ésta para distintas velocidades de deformación (Tabla 5-4) mediante la ecuación:

$$\eta_a = K \dot{\gamma}^{n-1}$$

(83)

C (°Brix)	T (°C)	Viscosidad aparente (Pa.s) a las velocidades de deformación (s ⁻¹):								
		50	100	150	200	300	400	500	700	1000
11	5	0,449	0,272	0,203	0,165	0,123	0,100	0,085	0,067	0,051
	10	0,420	0,255	0,190	0,154	0,115	0,093	0,080	0,062	0,048
	15	0,402	0,242	0,180	0,146	0,108	0,088	0,074	0,058	0,045
	25	0,348	0,211	0,157	0,128	0,095	0,077	0,066	0,052	0,040
	35	0,348	0,211	0,157	0,128	0,095	0,077	0,066	0,052	0,040
	45	0,281	0,172	0,128	0,105	0,078	0,064	0,054	0,043	0,033
	55	0,278	0,167	0,124	0,101	0,075	0,060	0,051	0,040	0,031
	60	0,250	0,154	0,115	0,094	0,071	0,058	0,049	0,039	0,030
14	5	0,523	0,314	0,232	0,187	0,139	0,112	0,095	0,074	0,057
	10	0,472	0,285	0,212	0,171	0,127	0,103	0,088	0,068	0,053
	15	0,417	0,251	0,187	0,151	0,112	0,091	0,077	0,060	0,046
	25	0,413	0,247	0,183	0,148	0,109	0,088	0,075	0,058	0,045
	35	0,361	0,218	0,162	0,131	0,097	0,079	0,067	0,052	0,040
	45	0,308	0,189	0,141	0,115	0,086	0,070	0,060	0,047	0,036
	55	0,283	0,175	0,131	0,107	0,081	0,066	0,056	0,044	0,034
	60	0,314	0,192	0,144	0,117	0,088	0,071	0,061	0,048	0,037
19,5	5	0,959	0,575	0,425	0,344	0,254	0,206	0,174	0,136	0,104
	10	0,973	0,571	0,417	0,334	0,244	0,196	0,165	0,127	0,096
	15	0,921	0,54	0,395	0,316	0,231	0,185	0,156	0,120	0,091
	25	0,859	0,508	0,373	0,299	0,220	0,177	0,149	0,115	0,088
	35	0,736	0,441	0,326	0,263	0,195	0,158	0,133	0,104	0,080
	45	0,665	0,401	0,298	0,241	0,179	0,145	0,123	0,096	0,074
	55	0,585	0,358	0,268	0,218	0,164	0,133	0,114	0,090	0,069
	60	0,547	0,335	0,250	0,204	0,153	0,125	0,106	0,084	0,065
24	5	1,872	1,091	0,795	0,635	0,463	0,369	0,310	0,239	0,181
	10	1,666	0,991	0,731	0,589	0,435	0,350	0,296	0,230	0,176
	15	1,704	1,006	0,739	0,594	0,437	0,351	0,296	0,229	0,174
	25	1,549	0,934	0,694	0,563	0,419	0,339	0,288	0,225	0,173
	35	1,398	0,849	0,634	0,515	0,385	0,312	0,266	0,209	0,161
	45	1,243	0,787	0,602	0,498	0,381	0,315	0,272	0,217	0,172
	55	1,188	0,742	0,562	0,462	0,351	0,288	0,248	0,197	0,155
	60	1,048	0,664	0,508	0,420	0,321	0,265	0,229	0,183	0,145
29	5	5,172	3,206	2,423	1,987	1,502	1,231	1,056	0,837	0,654
	10	4,898	3,079	2,346	1,935	1,474	1,216	1,047	0,836	0,658
	15	4,533	2,849	2,171	1,790	1,364	1,125	0,969	0,773	0,609
	25	3,974	2,533	1,946	1,614	1,240	1,028	0,889	0,715	0,567
	35	3,513	2,239	1,720	1,427	1,096	0,909	0,786	0,632	0,501
	45	3,190	2,061	1,596	1,332	1,031	0,860	0,747	0,605	0,483
	55	2,740	1,771	1,371	1,144	0,886	0,739	0,642	0,519	0,415
	60	2,640	1,718	1,336	1,118	0,869	0,727	0,633	0,514	0,412

Viscosidad aparente a varias velocidades de deformación para cremogenado de melocotón con distintos contenidos en sólidos solubles y temperaturas.

Se observa que la viscosidad aparente presenta un comportamiento similar al seguido por el índice de consistencia, es decir, que para una determinada concentración la viscosidad aparente disminuye al aumentar la temperatura, y para una temperatura fija la viscosidad aparente aumenta con la concentración de las muestras. También, tal y como era previsible, se aprecia cómo, en todos los casos, la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación.

En general, se observa que los valores del esfuerzo cortante, índice de consistencia y viscosidad aparente, a las diferentes velocidades de deformación a las que ha sido calculada, experimentan un fuerte aumento cuando la concentración de las muestras de cremogenado de melocotón pasa de 24 °Brix a 29 °Brix. Durán y Jiménez (1980) informan de un comportamiento similar en puré de albaricoque, el cual experimenta un fuerte incremento en los valores del índice de consistencia al superar los 20,5 °Brix.

Según estos autores este comportamiento podría ser explicado por la teoría de los "aglomerados" (Charm, 1963; Rha, 1975). Un cremogenado de fruta está constituido, básicamente, por una dispersión de partículas sólidas en una solución acuosa de azúcares, ácidos orgánicos, sales y pectinas, por lo que, desde un punto de vista general y según el criterio de clasificación seguido por Powrie y Tung (1976), se puede considerar al cremogenado de melocotón como una dispersión de la forma sólido/líquido y, debido al tamaño de las partículas suspendidas (superior a 0,5 μm) como un sol grueso o suspensión. Resulta, pues, evidente que su comportamiento reológico estará regido por las características de la fase sólida (forma, tamaño y concentración de las partículas) y por las de la fase líquida (naturaleza, forma tamaño y concentración de las especies moleculares que la componen). Conforme aumenta el grado de concentración, las partículas sólidas, en un principio individuales, irían quedando cada vez más próximas unas de otras, lo que facilitaría la formación de grumos, que a su vez, se unirían para formar agregados. Estos agregados también podrían asociarse llegando a formar una red o malla que atraparía la fase dispersante, provocando, de este modo, un fuerte incremento en los parámetros reológicos al alcanzar una determinada concentración crítica.

2.1 Efecto de la temperatura

Es un hecho comprobado que la temperatura ejerce una influencia sobre la viscosidad de los fluidos. Este efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente puede ser descrito mediante una ecuación de tipo Arrhenius (Rao 1977):

$$\eta_a = \eta_\infty \exp(E_a/RT) \quad (84)$$

Donde, η_a es la viscosidad aparente a una determinada velocidad de deformación, η_∞ es una constante, E_a es la energía de activación de flujo, R es la constante de los gases, y T es la temperatura absoluta.

Para líquidos que siguen la ley de la potencia se puede utilizar el índice de consistencia, en lugar de la viscosidad aparente, para determinar el efecto de la temperatura en el comportamiento al flujo (Rao *et al.*, 1984). Mediante un ajuste no lineal de los datos del índice de consistencia de la [Tabla 5-3](#) a la ecuación de Arrhenius se han obtenido los valores de las energías de activación al flujo y de la constante η del cremogenado de melocotón para distintas concentraciones en sólidos solubles estudiadas (Ver tabla siguiente).

C (°Brix)	E _a (kJ/mol)	η _∞ (Pa.s ⁿ)	r ²
11	8,41	0,102	0,962
14	9,58	0,144	0,956
19,5	11,09	0,171	0,954
24	13,68	0,204	0,979
29	12,88	0,286	0,999

Efecto de la temperatura sobre el índice de consistencia del cremogenado de melocotón con diferentes contenidos en sólidos solubles. Parámetros de la ecuación de Arrhenius.

Los valores que se han obtenido para la energía de activación varían entre 8,41 kJ/mol, para las muestras de cremogenado de melocotón de 11 °Brix, y 13,68 kJ/mol para las de 24 °Brix. Pese a que estos valores son muy similares para las diferentes concentraciones estudiadas, es posible advertir una clara tendencia a aumentar conforme se incrementa el contenido en sólidos solubles de las muestras de cremogenado, si bien, este aumento alcanza su máximo para la concentración de 24 °Brix, disminuyendo luego ligeramente cuando la concentración aumenta hasta 29 °Brix. Estos resultados son de un orden similar a los encontrados por otros autores en purés de frutas. Lozano e Ibarz (1992) encontraron valores de E_a de 10,5kJ/mol al estudiar la influencia de la temperatura en el comportamiento al flujo de pulpas concentradas de melocotón de 34,2 °Brix en el rango de temperaturas de 30-55 °C. Harper y Lebermann (1962) en puré de pera de 18,3-45,8 °Brix obtuvieron una E_a de 11,71 kJ/mol y Vitali y Rao (1982) obtuvieron una E_a de 15,4kJ/mol en puré de guayaba de 9,8-16 °Brix.

En general, puede decirse que los valores de E_a obtenidos son bajos, lo que indica que, dentro del intervalo estudiado de 5 °C a 60 °C, la temperatura ejerce una escasa influencia sobre el comportamiento reológico del cremogenado de melocotón. Según Sáenz y Costell (1986) y Saravacos (1970) la presencia de pulpa y de pectinas, en productos como los cremogenados, hace disminuir la influencia de la temperatura en su comportamiento reológico.

La constante η tiene valores relativamente elevados y presenta una ligera tendencia a aumentar con la concentración de las muestras.

En la [Figura 5-6](#) se ha representado de forma gráfica la variación de la viscosidad aparente, a una velocidad de deformación de 100 s⁻¹, en función de la inversa de la temperatura absoluta para cremogenado de melocotón a distintas concentraciones en sólidos solubles.

En la figura anterior se observa cómo la viscosidad aparente, calculada para una velocidad de deformación de 100 s⁻¹, aumenta al aumentar la inversa de la temperatura, lo que quiere decir que la viscosidad aparente disminuye al aumentar la temperatura. Esta variación presenta pendientes muy similares para las concentraciones de 11 a 24 °Brix, lo que indica que la temperatura afecta de igual modo a las muestras con estos contenidos en sólidos solubles. Sin embargo cuando la concentración de las muestras se incrementa hasta 29 °Brix la viscosidad aparente aumenta de forma mucho más rápida con respecto a la inversa de la temperatura, de lo que se desprende una mayor dependencia de la viscosidad aparente con la temperatura a esta concentración en sólidos solubles. Asimismo, se aprecia claramente cómo, para las concentraciones bajas, la viscosidad aparente, aún manteniendo pendientes similares, toma valores más altos al aumentar el contenido en sólidos solubles, salvo para las concentraciones de 11 y 14 °Brix, para las cuales la viscosidad aparente es prácticamente la misma. Cuando la concentración pasa de 24 °Brix a 29 °Brix se aprecia un fuerte incremento

en los valores de la viscosidad aparente con la inversa de la temperatura.

Con el objeto de analizar más detalladamente la correlación existente entre la temperatura y la viscosidad aparente se han ajustado los valores de la [Tabla 5-4](#) a la ecuación de Arrhenius con el fin de obtener los valores de η y las energías de activación, E_a . En la [Tabla 5-6](#) se dan los resultados de dicho ajuste.

C (°Brix)	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	E_a (kJ/mol)	η_{∞} (Pa.s)	r^2
11	50	7,814	0,0153	0,968
	100	7,704	0,0097	0,972
	150	7,641	0,0074	0,974
	200	7,595	0,0062	0,975
	300	7,531	0,0047	0,976
	400	7,486	0,0039	0,977
	500	7,451	0,0034	0,977
	700	7,398	0,0027	0,977
	1000	7,342	0,0021	0,976
14	50	7,782	0,0173	0,932
	100	7,454	0,0119	0,933
	150	7,263	0,0096	0,934
	200	7,127	0,0082	0,933
	300	6,935	0,0066	0,933
	400	6,799	0,0057	0,932
	500	6,694	0,0050	0,932
	700	6,534	0,0042	0,930
	1000	6,366	0,0035	0,928
19,5	50	8,276	0,0286	0,969
	100	7,767	0,0209	0,978
	150	7,469	0,0017	0,983
	200	7,257	0,0153	0,985
	300	6,959	0,0128	0,988
	400	6,748	0,0112	0,990
	500	6,584	0,0102	0,990
	700	6,337	0,0087	0,990
	1000	6,075	0,0074	0,988
24	50	7,332	0,0781	0,970
	100	6,201	0,0744	0,967
	150	5,539	0,0723	0,962
	200	5,069	0,0709	0,955
	300	4,407	0,0689	0,94
	400	3,938	0,0676	0,921
	500	3,574	0,0665	0,989
	700	3,024	0,0650	0,849
	1000	2,442	0,0634	0,760
29	50	9,526	0,0849	0,998
	100	8,623	0,0687	0,996

150	8,570	0,0607	0,994
200	8,319	0,0556	0,993
300	7,966	0,0491	0,991
400	7,716	0,0450	0,989
500	7,522	0,0420	0,987
700	7,229	0,0379	0,984
1000	6,919	0,0340	0,980

Efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente calculada a diferentes velocidades de deformación en cremogenado de melocotón con diferentes contenidos en sólidos solubles.

Se observa que los valores de las energías de activación para una determinada concentración disminuyen a medida que aumenta la velocidad de deformación. Esta disminución es muy ligera para las concentraciones más bajas, por ejemplo, para una concentración de 11 °Brix, la viscosidad aparente, para una velocidad de deformación de 50 s^{-1} , es de 7,814 kJ/mol y cuando la velocidad de deformación aumenta hasta 1000 s^{-1} la viscosidad aparente disminuye menos de 0,5 kJ/mol alcanzando un valor de 7,342 kJ/mol. El descenso de la energía de activación provocado por el aumento de la velocidad de deformación se hace más patente al aumentar la concentración de las muestras, de este modo, en las muestras de cremogenado de melocotón con una concentración de 29 °Brix la viscosidad aparente disminuye desde 9,526 kJ/mol, a una velocidad de deformación de 50 s^{-1} , hasta 6,919 kJ/mol cuando la velocidad de deformación aumenta a 1000 s^{-1} . Sin embargo, merecen una atención especial los resultados, un tanto irregulares, que se han obtenido en las muestras de 24 °Brix. Las energías de activación alcanzadas en este caso han resultado ser, para todas la velocidades de deformación, inferiores a las conseguidas para muestras más diluidas, con valores que pasan de 7,332 kJ/mol para una velocidad de deformación de 50 s^{-1} , a 2,442 kJ/mol a una velocidad de deformación de 1000 s^{-1} consiguiendo, además, con casi 5 kJ/mol, el mayor decremento de la energía de activación dentro del rango de velocidades de deformación considerado.

En general, los resultados obtenidos indican, pues, que la temperatura tiene un efecto más notable sobre la viscosidad aparente cuando el cremogenado de melocotón es cizallado a velocidades de deformación más bajas, y su contenido en sólidos solubles es más alto.

[Tabla 5-6](#)

De los resultado obtenidos se deducen algunas consideraciones que pueden ser aplicadas al proceso de elaboración de los cremogenados. Como se ha dicho el cremogenado de melocotón se comporta como un fluido seudoplástico, es decir, para una concentración y una temperatura determinadas, su viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación. Esto indica que en los equipos de procesado, tales como evaporadores y equipos de calentamiento, la propia agitación resulta beneficiosa en la transmisión de calor. Además, para velocidades de deformación altas, las energías de activación son más elevadas para las muestras de cremogenado menos concentradas, lo que indica que para estas concentraciones resulta preferible trabajar a temperaturas más altas, aunque no puede trabajarse a temperaturas demasiado elevadas ya que el calor puede provocar reacciones de pardeamiento no enzimático.

Como se observa en la [Tabla 5-6](#), con el aumento de la velocidad de deformación no sólo disminuye la viscosidad aparente, sino que también lo hace la energía de activación. El primero de estos efectos resulta beneficioso en los procesos de trasmisión de calor, mientras que el segundo no lo es, por lo que para obtener las condiciones óptimas de transmisión de calor deberán buscarse los valores óptimos de velocidad de deformación y temperatura.

Concluyendo, puede decirse que para fluidos cuyo comportamiento no sea

newtoniano, deben evaluarse los efectos de la temperatura y de otras variables del proceso a distintas velocidades de deformación (Vitali *et al.*, 1974; Ibarz y Pagán, 1987b).

2.2 Efecto de la concentración

El efecto de la concentración sobre el comportamiento reológico de zumos y cremogenados de fruta se puede describir según diversos autores (Saravacos, 1970; Rao *et al.*, 1984) mediante los siguientes modelos matemáticos:

$$\text{Modelo potencial:} \quad \eta = K_1 C^{A_1} \quad (85)$$

$$\text{Modelo exponencial:} \quad \eta = K_2 \exp(A_2 C) \quad (86)$$

donde K_1 , K_2 , A_1 y A_2 son constantes y C es la concentración de sólidos solubles en °Brix.

Se ha estudiado la variación del índice de consistencia con la concentración de las muestras de cremogenado de melocotón. De los resultados de los ajustes se desprende que el modelo exponencial define mejor el comportamiento reológico del cremogenado de melocotón industrial de melocotón, ya que es el que presenta valores de coeficientes de determinación, r^2 , más altos, por lo que en adelante únicamente se hace referencia a este modelo. Estos resultados difieren de los de algunos estudios previos realizados en purés de frutas y vegetales, en los cuales se afirma que la viscosidad aparente o el índice de consistencia y la concentración del producto estudiado están relacionados por una función de tipo potencial (Harper y Lebermann, 1962; Harper y El-Sahrigi, 1965; Rao *et al.*, 1981; Vitali y Rao, 1982). Sin embargo, los resultados aquí expuestos coinciden con los de otros estudios realizados por Vitali *et al.*, (1974), Rao *et al.*, (1984) y Vitali y Rao (1984) quienes también afirman que el modelo exponencial define de forma más satisfactoria el efecto que la concentración ejerce sobre la viscosidad aparente y sobre el índice de consistencia en algunos purés y zumos de fruta.

En la Tabla 5-7 se recogen los valores de los parámetros correspondientes al modelo exponencial, así como los coeficientes de determinación obtenidos a partir de los distintos ajustes para las diferentes temperaturas ensayadas. En todos los casos tanto los ajustes como los estimados de los parámetros han resultado significativos con un nivel de confianza del 95%.

T (°C)	K_2 (Pa.s ⁿ)	A_2 (°Brix ⁻¹)	r^2
5	0,435	0,133	0,993
10	0,435	0,128	0,995
15	0,371	0,129	0,990
25	0,377	0,122	0,998
35	0,323	0,118	0,993
45	0,073	0,119	0,989
55	0,104	0,113	0,981
60	0,064	0,111	0,994

Efecto de la concentración sobre el índice de consistencia para cremogenado de melocotón. Parámetros resultantes del ajuste al modelo exponencial: $\eta = K_2 \exp(A_2 C)$.

Como se puede apreciar en la Tabla 5-7, el parámetro K_2 tiende a disminuir al aumentar la temperatura. Los valores de este parámetro han oscilado desde 0,435 Pa.sⁿ a una temperatura de 5 °C hasta 0,064 Pa.sⁿ a los 60 °C.

Un comportamiento similar se observa en el parámetro A_2 que, aunque de manera casi imperceptible, también disminuye al aumentar la temperatura. Los valores de este parámetro tan sólo han disminuido desde $0,133 \text{ }^\circ\text{Brix}^{-1}$, para una temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta $0,111 \text{ }^\circ\text{Brix}^{-1}$ a los $60 \text{ }^\circ\text{C}$, es decir tan sólo un descenso de $0,022 \text{ }^\circ\text{Brix}^{-1}$ en el rango de temperaturas que abarca de los 5 a los $60 \text{ }^\circ\text{C}$. El comportamiento del parámetro A_2 en función de la temperatura ofrece una indicación del efecto de la concentración sobre el índice de consistencia, de forma que si A_2 disminuye al aumentar la temperatura, el efecto de la concentración es menor a medida que la temperatura aumenta. En el caso concreto del estudio realizado en cremogenado de melocotón la evolución del parámetro A_2 indica que el efecto de la concentración es mayor a temperaturas más bajas.

En la [Figura 5-7](#) se han representado los puntos experimentales que determinan la evolución de la viscosidad aparente calculada a 100 s^{-1} en función de la concentración, medida en $^\circ\text{Brix}$. También se han representado las líneas correspondientes a los ajustes de los valores experimentales al modelo exponencial.

Analizando la [Figura 5-7](#) se observa cómo la viscosidad aparente calculada para una velocidad de deformación de 100 s^{-1} aumenta de forma exponencial conforme aumenta la concentración de las muestras de cremogenado de melocotón. También se aprecia cómo los valores de la viscosidad, para una concentración determinada, son mayores a temperaturas más bajas. Además, cuanto mayor es la concentración de las muestras, mayor es la diferencia entre los valores que toma la viscosidad aparente para las distintas temperaturas de trabajo.

2.3 Efecto combinado de la concentración y temperatura

El cremogenado de melocotón, y en general los productos derivados de fruta, están sometidos durante las distintas fases de su proceso de elaboración a diferentes temperaturas y concentraciones. Resulta útil, por tanto, obtener una única expresión que relacione la viscosidad aparente o el índice de consistencia del fluido con la concentración del cremogenado y la temperatura de trabajo, ya que el comportamiento al flujo del producto condicionará de alguna forma los fenómenos de transferencia de cantidad de movimiento y de calor. Con esta finalidad se han analizado una serie de modelos que permitan determinar esta relación.

Varios autores (Saravacos, 1970; Rao *et al.*, 1984; Khalil *et al.*, 1989; Ibarz *et al.*, 1995) definen el siguiente modelo matemático como el más idóneo para explicar el efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre el índice de consistencia de derivados de fruta:

$$\text{Modelo 1: } k_{C1} = \alpha_1 \exp \left(\frac{E_a}{RT} + \beta_1 C \right) \quad (87)$$

donde: K_{C1} es el índice de consistencia del modelo combinado 1, α_1 , y β_1 son constantes, E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases, T es la temperatura en Kelvin y C es la concentración en $^\circ\text{Brix}$.

Los resultados obtenidos de dicho ajuste han sido los siguientes:

$$\alpha_1 = 0,016 \text{ (Pa.s}^n\text{)}$$

$$\beta_1 = 0,122 \text{ (}^\circ\text{Brix}^{-1}\text{)}$$

$$E_a = 11,167 \text{ kJ/mol}$$

$$r^2 = 0,990$$

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, se puede redefinir la expresión correspondiente al modelo 1 para el cremogenado de melocotón, y queda de la forma:

$$\text{Modelo 1: } k_{C1} = 0,016 \exp\left(\frac{1343}{T} + 0,122C\right) \text{ (Pa.s}^n\text{)} \quad (88)$$

Además del modelo combinado anterior, algunos autores han utilizado otros modelos que permiten combinar en una única expresión el efecto de la temperatura y de la concentración (Vitali y Rao, 1982; Rao *et al.*, 1984). En realidad se trata de un modelo que combina la ecuación de Arrhenius y el modelo de la potencia, donde los valores del factor de frecuencia y de la energía de activación han sido sustituidos por sus correspondientes expresiones en función de la concentración ajustadas al modelo de la potencia:

$$\text{Modelo 2: } k_{C2} = k_1 C^{k_2} \exp\left(\frac{k_3 C^{k_4}}{RT}\right) \quad (89)$$

De este modo, a partir de los valores del factor de frecuencia, η , se realiza un nuevo ajuste frente a la concentración a la ecuación:

$$\eta_{\infty} = k_1 C^{k_2} \quad (90)$$

donde: η es el factor de frecuencia calculado según la ecuación de Arrhenius, k_1 y k_2 son constantes y C es la concentración en °Brix.

Los resultados del ajuste han sido:

$$k_1 = 0,01 \text{ (Pa.s}^n\text{/}^\circ\text{Brix}^{0,96}\text{)}$$

$$k_2 = 0,96 \text{ (adimensional)}$$

$$r^2 = 0,980$$

De este modo, a partir de los valores de E_a y de η de la [Tabla 5-8](#) del apartado, se realiza un nuevo ajuste de la energía de activación frente a la concentración a la ecuación:

$$E_a = k_3 C^{k_4} \quad (91)$$

donde: E_a es la energía de activación calculada según la ecuación de Arrhenius, k_3 y k_4 son constantes y C es la concentración en °Brix.

Los resultados del ajuste han sido:

$$k_3 = 2,59 \text{ (kJ/mol)}^{0,49}$$

$$k_4 = 0,49 \text{ (adimensional)}$$

$$r^2 = 0,961$$

Así pues, sustituyendo los valores obtenidos de los ajustes en las ecuaciones correspondientes se obtienen las siguientes expresiones para la energía de activación y el factor de frecuencia en función de la concentración:

$$E_a = 2,59 C^{0,49} \quad \text{(kJ/mol)} \quad (92)$$

$$\eta_{\infty} = 0,01 C^{0,96} \quad \text{(Pa.s}^n\text{)} \quad (93)$$

A partir de estas nuevas ecuaciones se ha podido redefinir la ecuación de Arrhenius, de tal forma que se ha obtenido el índice de consistencia en función de la concentración (en

°Brix) y de la temperatura (en Kelvin), quedando de la siguiente forma:

$$\text{Modelo 2: } K_{C2} = 0,01 C^{0,96} \exp\left(\frac{2,59 C^{0,49}}{RT}\right) (\text{Pa}\cdot\text{s}^n) \quad (94)$$

en la que $R = 8,31410^{-3}$ kJ/mol.

Un tercer modelo combinado está basado en el modelo exponencial del efecto de la concentración donde sus parámetros K_2 y A_2 son expresados como una función lineal y exponencial de la temperatura respectivamente:

$$\text{Modelo 3: } K_{C3} = (k_5 + k_6 T) \exp[(\exp(k_7 + k_8 T))C] \quad (95)$$

donde T es la temperatura en °C y C la concentración en °Brix.

Los valores de K_2 de la [Tabla 5-7](#) se ajustan frente a la temperatura a la ecuación lineal:

$$K_2 = k_5 + k_6 T \quad (96)$$

Los resultados que se han obtenido del ajuste son los siguientes:

$$k_5 = 0,5 (\text{Pa}\cdot\text{s}^n)$$

$$k_6 = -7,410^{-3} (\text{°C}^{-1})$$

$$r^2 = 0,943$$

Igualmente, los valores de A_2 se han ajustado a la ecuación:

$$A_2 = \exp(k_7 + k_8 T) \quad (97)$$

obteniéndose los siguientes resultados:

$$k_7 = -2,01 (\text{°Brix}^{-1})$$

$$k_8 = -3,0310^{-3} (\text{°C}^{-1})$$

$$r^2 = 0,976$$

De este modo las ecuaciones anteriores quedan de la forma:

$$K_2 = 0,5 + 7,4 \cdot 10^{-3} T \quad (\text{Pa}\cdot\text{s}^n) \quad (98)$$

$$A_2 = \exp(2,01 - 3,03 \cdot 10^{-3} T) \quad (\text{°Brix}^1) \quad (99)$$

A partir de estas nuevas ecuaciones se ha redefinido el modelo exponencial, de forma que se puede obtener el índice de consistencia en función de la temperatura (en °C) y de la concentración (en °Brix), quedando de la forma siguiente:

$$\text{Modelo 3: } K_{C3} = (0,5 - 7,4 \cdot 10^{-3} T) \exp[(\exp(-2,01 - 3,03 \cdot 10^{-3} T))C] (\text{Pa}\cdot\text{s}^n) \quad (100)$$

A partir de las expresiones deducidas de los tres modelos se han calculado los índices de consistencia para cada una de las concentraciones a todas las temperaturas de trabajo ensayadas. Los valores obtenidos, así como el índice de consistencia calculado a partir de los datos experimentales mediante ajuste al modelo de la ley de la potencia ($K_{\text{experimental}}$) se muestran en la siguiente tabla:

C (°Brix)	T (°C)	K _{experimental}	K _{C1}	K _{C2}	K _{C3}
11	5	7,50	7,70	1,97	3,79
	10	7,02	7,01	1,78	3,53
	15	6,99	6,46	1,59	3,32
	25	5,82	5,50	1,23	2,94
	35	5,82	4,75	0,90	2,63
	45	4,52	4,15	0,60	2,38
	55	4,83	3,68	0,32	2,17
	60	3,86	3,44	0,19	2,01
14	5	9,47	11,10	2,93	7,55
	10	8,22	10,11	2,63	6,97
	15	7,25	9,32	2,33	6,51
	25	7,47	7,94	1,78	5,68
	35	6,29	6,84	1,29	5,01
	45	4,96	5,99	0,85	4,47
	55	4,39	5,30	0,45	4,04
	60	5,06	4,96	0,26	3,81
19,5	5	17,36	21,72	6,07	21,36
	10	19,79	20,02	5,37	19,45
	15	18,73	18,24	4,72	17,95
	25	16,81	18,24	3,53	15,28
	35	13,31	15,53	2,50	13,19
	45	11,57	11,71	1,63	11,54
	55	9,42	10,38	0,84	10,23
	60	8,80	9,70	0,49	9,57
24	5	39,60	37,62	11,00	43,67
	10	31,33	34,24	9,46	39,37
	15	33,33	31,59	8,36	36,02
	25	26,94	26,89	6,17	30,15
	35	23,38	23,20	4,29	25,62
	45	16,44	20,28	2,76	22,09
	55	16,99	17,97	1,40	19,34
	60	13,87	16,80	0,82	17,96
29	5	76,91	69,24	21,28	87,91
	10	67,36	63,03	18,48	78,46
	15	62,33	58,15	15,92	71,17
	25	50,54	49,49	11,48	58,56
	35	44,68	42,69	7,82	48,98
	45	37,51	37,33	4,97	41,63
	55	32,22	33,08	2,46	35,97
	60	29,86	30,93	1,44	33,16

Relación entre el índice de consistencia experimental (calculado según el modelo de la ley de la Potencia) y los teóricos (calculados según los modelos combinados) en el cremogenado de melocotón.

En todos los casos tanto los ajustes como los estimados de los parámetros han resultado significativos con un nivel de confianza del 95 %.

Los resultados obtenidos de los ajustes de los datos a la forma linealizada de las ecuaciones anteriores mediante el método de los mínimos cuadrados, han confirmado que el modelo 1 define de forma mucho más satisfactoria el efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre el índice de consistencia de cremogenado de melocotón. Esto mismo fue confirmado por distintos autores (Saravacos, 1970; Rao *et al.*, 1984; Khalil *et al.*, 1989; Ibarz *et al.*, 1995), quienes coinciden al indicar el modelo 1 como el más adecuado para determinar el citado efecto combinado de la temperatura y la concentración.

Como se puede apreciar al analizar los datos de [Tabla 5-8](#) los índices de consistencia calculados según tres modelos combinados siguen la misma tendencia que el índice de consistencia experimental, de forma que para una misma concentración disminuyen al aumentar la temperatura y, a su vez, los valores aumentan al aumentar la concentración de las muestras de cremogenado de melocotón. Además se observa que los valores obtenidos con el modelo 1 son los que más se asemejan a los experimentales, especialmente a concentraciones bajas de las muestras.

2.4 Evaluación de los modelos combinados

Con el fin de realizar un análisis comparativo de los tres modelos combinados se ha realizado un ajuste lineal entre el índice de consistencia experimental y cada uno de los teóricos, de tal manera que los parámetros de las ecuaciones resultantes aporten datos objetivos a la hora de decidir cuál de los tres modelos es el más apropiado. Así, además del coeficiente de determinación (r^2), se ha tenido en cuenta que la regresión presente una pendiente próxima a la unidad y una ordenada en el origen próxima a cero. En la tabla siguiente se detallan los parámetros resultantes de estos ajustes.

Modelo	Ordenada Origen	Pendiente	r^2
1	-1,5 0,9	1,07 0,03	0,993
2	2,2 0,7	0,83 0,02	0,991
3	5,4 2,8	3,4 0,4	0,879

Parámetros de los ajustes del índice de consistencia experimental frente a los calculados según los modelos combinados. Ajuste a la expresión: $K_{\text{experimental}} = a + bK_{\text{calculado}}$.

Además se han representado gráficamente los índices de consistencia experimentales frente a los calculados (Ver las siguientes figuras).

[Figura 5-8](#)

[Figura 5-9](#)

[Figura 5-10](#)

Se puede observar, a partir de los resultados obtenidos, que el modelo que mejor describe el efecto combinado de la temperatura y de la concentración sobre el índice de consistencia en cremogenado de melocotón es el modelo 1, que viene expresado por la ecuación:

$$K_{C1} = 0,016 \exp\left(1343 \frac{1}{T} + 0,122 C\right) \quad (101)$$

en la que K_{C1} es el índice de consistencia expresado en (Pa.sⁿ), T es la temperatura de trabajo en Kelvin y C es la concentración de las muestras en °Brix.

3 Recuentos microbiológicos

Para el estudio de la microflora presente en el cremogenado de melocotón industrial se han tomado muestras en dos puntos del proceso de producción, tras el tamizado y en el producto final. En total se han analizado 92 muestras: 14 de fruta tamizada, 73 de producto acabado y 5 muestras de producto alterado.

La tabla siguiente muestra, de forma resumida, los recuentos de los microorganismos aerobios mesófilos (para una información más detallada ver Anejo 1).

	Fruta tamizada	Producto acabado	Producto alterado
Número de muestras analizadas	14	73	5
Recuento total de aerobios mesófilos	0-30	<10	>10 ⁴
Recuento de mohos y levaduras	<10	0-30	>10 ⁴

Recuentos microbiológicos medios (pfc/g) de las muestras de cremogenado de melocotón.

Los niveles de contaminación microbiana en las diferentes muestras sin signos de alteración han sido siempre muy bajos. Así el recuento medio de aerobios mesófilos ha sido en las muestras de fruta triturada de 0-30 y < 10 pfc/g en el producto acabado; mientras que los recuentos de mohos y levaduras han invertido esta relación con valores medios < 10 pfc/g en la fruta tamizada y < 30 pfc/g en el producto acabado. Únicamente, tal y como era previsible, en las muestras de producto alterado se han contabilizado recuentos medios de aerobios mesófilos y de mohos y levaduras superiores a 10⁴ pfc/g.

Turtura *et al.* (1988) encontraron resultados similares al estudiar la microflora de varios productos derivados de fruta, entre los que se encontraban zumos y pulpas de melocotón.

En la [Figura 5-11](#) se muestra el nivel de contaminación por aerobios mesófilos de las muestras estudiadas de fruta triturada y producto acabado.

El porcentaje de muestras en las que no se ha detectado la presencia de ningún microorganismo ha sido notablemente mayor en el producto acabado (49 %) que en la fruta triturada (14 %). Del mismo modo, un 41% de las muestras de producto acabado han tenido recuentos comprendidos entre 1 y 5 pfc/g mientras que en la fruta triturada este porcentaje se ha reducido al 29%.

Los recuentos de mohos y levaduras, como aparece en la [Figura 5-12](#), han presentado unos resultados bien distintos, presentando mayores valores e incidencia en el producto acabado, estando presentes en 35 muestras (48,6 %). En fruta triturada la mayor parte de las muestras (un 79%) ha presentado ausencia de mohos y levaduras y tan sólo 3 muestras (un 21%) han dado recuentos de 10 pfc/g.

Los recuentos tan bajos obtenidos pueden explicarse por el propio proceso de fabricación del cremogenado. Como se ha explicado anteriormente en la elaboración del cremogenado de melocotón, la fruta utilizada se somete a tres lavados consecutivos, en uno de los cuales se adiciona hipoclorito sódico. Con esta serie de lavados, además de eliminar la suciedad existente, se consigue reducir considerablemente la flora microbiana superficial. Según algunos autores la carga microbiana de las frutas sin lavar varía entre 10² y 10⁸ pfc/g,

pero un lavado cuidadoso puede reducirla a una décima parte o incluso más (Muller, 1981).

Además del lavado hay que considerar que el muestreo de la fruta triturada se ha realizado justamente a la salida de un tratamiento térmico de inactivación enzimática (3 minutos a 90-95 °C) lo que produce una importante reducción en la microflora de la fruta triturada. Así mismo, el producto acabado ha sido sometido a un proceso de pasteurización en el que se ha eliminado la casi totalidad de los microorganismos existentes, por lo que los microorganismos presentes en los recuentos efectuados hay que atribuirlos mayoritariamente a posibles contaminaciones del producto en tuberías y tanques, durante el transporte y almacenamiento.

4 Caracterización de la microflora presente

4.1 Identificación preliminar

Del conjunto de muestras estudiadas se han aislado un total 186 microorganismos para proceder a su posterior identificación.

Tras una identificación preliminar, realizada mediante observaciones macroscópicas (culturales) y observación microscópica (tinciones Gram), los aislamientos se han clasificado en bacterias, mohos y levaduras. Así, de los 186 aislamientos, 102 (54,8 %) han sido clasificados como bacterias, 60 (32,3 %) como mohos y 24 (12,9 %) como levaduras.

La incidencia de los distintos grupos microbianos en las muestras de cremogenado de melocotón analizadas se presenta en la tabla siguiente:

	Fruta triturada	Producto acabado	Producto alterado
Bacterias			
Bacilos esporulados	57,1	7,7	nd
Cocos Gram +	21,4	7,7	nd
Bacilos Gram -	7,1	2,7	nd
Bacterias lácticas			
Lactobacilos	nd	21,7	nd
Cocos	90,0	95,7	100
Total	90,0	95,7	100
Mohos	14,3	48,7	nd
Levaduras	14,3	5,1	100

Incidencia^a de la microflora bacteriana en cremogenado de melocotón.

^a Los resultados están expresados en % de muestras en las que se ha detectado presencia de los distintos grupos microbianos.

nd: no detectado.

4.2 Microflora bacteriana

La microflora bacteriana que se ha aislado de las muestras estudiadas de cremogenado de melocotón se ha agrupado en cuatro bloques:

- Bacilos Gram + esporulados.
- Bacilos Gram -.
- Cocos Gram +.
- Bacterias lácticas.

4.2.1 Bacilos Gram + esporulados

Ha sido uno de los grupos con mayor incidencia, pues ha sido aislado en el 57,1% de las muestras de fruta tamizada (Tabla 5-11). Las principales especies de este grupo que se han aislado han sido: *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus badius*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus azotoformans* y *Bacillus schlegelii* (Ver tabla siguiente).

	Fruta tamizada	Producto acabado	Productoalterado
Bacterias			
<i>Bacillus brevis</i>	2	2	0
<i>B. megaterium</i>	9	2	0
<i>B. badius</i>	34	6	0
<i>B. globisporus</i>	2	0	0
<i>B. azotoformans</i>	0	2	0
<i>B. sphaericus</i>	0	1	0
<i>B. schlegelii</i>	0	2	0
<i>Micrococcus luteus</i>	7	12	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	9	0
<i>Leuconostoc</i> sp.	1	3	5
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2	0
Total Aislamientos	56	41	5
Mohos			
<i>Aspergillus</i> sp.	1	8	0
<i>Penicillium</i> sp.	0	20	0
<i>Cladosporium</i> sp.	1	6	0
<i>Alternaria</i> sp.	0	4	0
<i>Fusarium</i> sp.	0	7	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	1	0
Otros	10	2	0
Total Aislamientos	12	48	0
Levaduras			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	2	7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	0	0
<i>Candida kefir</i>	0	8	0
<i>Candida coliculosa</i>	0	2	0
<i>Candida magnoliae</i>	0	0	1
<i>Kloeckera apiculata</i>	1	0	2
Total Aislamientos	2	12	10

Especies y número de aislamientos de bacterias, mohos y levaduras identificados en las muestras de cremogenado de melocotón.

Sin embargo, tras el tratamiento térmico de pasteurización a que es sometido el cremogenado, la incidencia de este grupo baja notablemente, siendo detectadas especies de bacilos Gram + esporulados solamente en el 7,7% de las muestras analizadas. Este descenso en la presencia de estos microorganismos debe ser atribuido principalmente a los efectos del tratamiento térmico de pasteurización, aunque no exclusivamente, ya que existen otros factores como la actividad de agua (a_w) y el pH que pueden influir en la supervivencia y viabilidad de estos microorganismos.

El pH de las muestras de cremogenado de melocotón estudiadas oscila en torno al

3,81, valor que puede considerarse bastante ácido en el caso de productos alimentarios. Según Corlett y Brown (1983), cuando la acidez es lo suficientemente alta como para detener el crecimiento bacteriano, el período de tiempo que los microorganismos pueden mantenerse viables puede ser un dato crítico para evaluar su contribución potencial al deterioro de los alimentos. En las condiciones adversas provocadas por esta alta acidez, los microorganismos pueden verse privados de la energía de mantenimiento necesaria para regular su medio iónico interno y para renovar sus componentes celulares, produciendo como resultado una pérdida de la viabilidad. Dicha pérdida de viabilidad se produce de forma progresiva y conforme se prolonga la permanencia de los microorganismos en condiciones estrictas de pH, lo que provoca que sólo las especies esporuladas y más abundantes, permanezcan en forma de esporas, algunas de las cuales tal vez puedan sobrevivir al tratamiento de pasteurización, y aunque no sean capaces de desarrollarse en el cremogenado de melocotón, aparecen en los recuentos de las muestras del producto acabado.

4.2.2 Bacilos Gram -

La presencia de este tipo de microorganismos en las muestras estudiadas de cremogenado de melocotón estudiadas puede considerarse muy poco importante, ya que solamente se han aislado 3 cepas de bacilos Gram - pertenecientes al género *Pseudomonas* (Tabla 5-12).

La presencia de *Pseudomonas* sp. como único representante del grupo de los bacilos Gram - en cremogenado de melocotón puede explicarse por el hecho de que es una de las principales bacterias pectinolíticas causantes de marchitamientos y podredumbres en material vegetal, tanto en hortalizas como en frutas frescas (King y Bolin, 1989). A esto hay que añadir la circunstancia de que la materia prima utilizada en la fabricación de cremogenado de melocotón corresponde en su mayoría a frutos procedentes de excedentes y generalmente no aptas para la comercialización directa, lo que provoca que se procesen frutos con presencia de partes podridas, que aunque suelen ser eliminados en la fase de selección, pueden contaminar superficialmente otros frutos y de esta forma pasar al proceso industrial. Sin embargo hay que señalar que *Pseudomonas* sp. no crece a pH igual o inferior 5,3 (Labadie *et al.*, 1975; Bem *et al.*, 1976), por lo que su presencia en el cremogenado de melocotón debe ser considerada como meramente ocasional, ya que los valores del pH de las muestras de cremogenado de melocotón, como se ha indicado anteriormente, son mucho más bajos.

4.2.3 Cocos Gram +

Este grupo de bacterias ha presentado un comportamiento similar al de los bacilos Gram + esporulados, si bien su incidencia ha sido menor, presentándose en el 21,4% de las muestras de fruta tamizada y en el 7,7% de las muestras de producto acabado (Tabla 5-11).

El género más frecuentemente aislado dentro de este grupo ha sido *Micrococcus*, y, concretamente, la especie *Micrococcus luteus*. También se han aislado especies del género *Leuconostoc* (Tabla 5-12).

La menor incidencia de este grupo en las muestras de producto acabado con respecto a las de fruta tamizada debe atribuirse, análogamente a lo ya expuesto para los bacilos Gram + esporulados, no sólo al tratamiento térmico, sino también a las condiciones de pH y a_w del medio, ya que por ejemplo, la especie más frecuente, *Micrococcus luteus*, no crece a a_w inferior a 0,93. Estas condiciones adversas deben interferir en sus procesos vitales hasta el punto de hacerla más vulnerable al tratamiento térmico de pasteurización.

4.2.4 Bacterias lácticas

Ha sido el grupo bacteriano más homogéneo, dado que se han presentado en el mayor número de muestras, aunque sus recuentos han sido muy bajos. Hay que señalar que dentro de este grupo los aislamientos de formas cocáceas han sido numéricamente superiores a las bacilares ([Tabla 5-11](#)). Únicamente en el 21,7 % de las muestras de producto acabado se ha detectado presencia de lactobacilos no detectándose en las muestras de fruta triturada ni en las de producto alterado. En cambio, las bacterias lácticas con forma de cocos se han detectado en el 90 % de las muestras de fruta triturada, en el 95,7 % de las de producto acabado y en el 100 % de las muestras de producto alterado. Estos resultados son completamente lógicos pues las bacterias lácticas, procedentes del material de partida, son capaces de sobrevivir y desarrollarse en unas condiciones de pH y acidez tan particulares como las que presenta el cremogenado de melocotón (Muller, 1981).

En una población mixta la acidez puede actuar como agente selector de un componente de la población inicial que sea particularmente tolerante. Las levaduras y las bacterias lácticas resultan a menudo seleccionadas por efecto de los bajos valores de pH. Así, en zumos de frutas no concentrados, almacenados a temperaturas bajas, suelen predominar fermentaciones ácidas debidas a *Leuconostoc* sp. Por norma general las bacterias responsables del deterioro de alimentos ácidos (pH menor de 4,5) son todas Gram +, y principalmente bacterias lácticas (Corlett y Brown, 1983).

4.3 Mohos

Los mohos se han clasificado hasta el nivel de género, siguiendo las claves de las principales monografías especializadas en la materia (ver apartado de Material y métodos).

En la [Tabla 5-11](#) se muestra la incidencia de mohos en los distintos productos de cremogenado de melocotón estudiados.

Los mohos han tenido una incidencia moderadamente importante en la fruta triturada, estando presentes en un 14,3 % de las muestras. Sin embargo, han experimentado un notable incremento en el producto acabado, detectándose en casi la mitad de estas muestras (48,7 %). En el producto alterado no se detectó presencia alguna de mohos.

La identificación de los mohos se ha realizado según se describe en el apartado de Material y métodos. Se han analizado 60 aislamientos procedentes de las muestras de fruta tamizada y producto acabado. Los resultados han permitido agrupar los aislamientos en los 6 géneros siguientes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Trichoderma*. El resto de mohos que no han sido identificados como ninguno de los géneros anteriores se han reunido en un grupo denominado "Otros" ([Tabla 5-12](#)).

Los resultados obtenidos tras realizar las pruebas de identificación revelaron una notable diversidad de géneros. La distribución de las cepas encontradas muestra importantes diferencias entre los aislamientos procedentes de la fruta triturada y los del producto acabado.

La mayoría de las cepas aisladas de fruta triturada pertenecen a mohos típicos de campo, procedentes del fruto y sin apenas importancia desde el punto de vista de las alteraciones alimentarias.

El género más frecuentemente aislado en el producto acabado es *Penicillium*, que ha supuesto el 42 % de los aislamientos de mohos en este producto. Esto contrasta claramente con los resultados obtenidos para fruta triturada, donde no se ha identificado ninguna cepa del género *Penicillium*. Otros géneros encontrados en este producto, aunque en menor cantidad, han sido *Aspergillus* (17 %), *Fusarium* (15 %) y *Cladosporium* (13 %).

En las muestras de cremogenado de melocotón alteradas que se han estudiado no se

ha detectado la presencia de mohos.

Los mohos son organismos eminentemente aerobios cuyo pH óptimo de crecimiento es ligeramente ácido, y son capaces de crecer a valores de actividad de agua relativamente reducidos (Baird y Kooiman, 1985). Estas características les permiten adaptarse adecuadamente a las condiciones de hábitat que ofrece el cremogenado de melocotón, aunque su metabolismo estrictamente aerobio limita su crecimiento en profundidad, por lo que manifiestan un buen crecimiento únicamente en la superficie del producto. Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* se caracterizan por ser capaces de crecer a altas concentraciones de azúcares disueltos y bajos valores de pH, destacando *Penicillium italicum* que puede crecer a pH de hasta 1,9 (Kooiman, 1977).

En trabajos realizados por algunos investigadores se citan a estos dos géneros como los más abundantes en productos derivados de frutas. Así pues, Dragoni y Comi (1985) aislaron cuatro especies fúngicas en zumos de fruta producidos industrialmente: *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum*, *Byssochlamys fulva* y *Byssochlamys nivea*. En este mismo estudio los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* estuvieron presentes en el 23 % de las muestras. Turtura *et al.* (1988) también aislaron principalmente especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (el 65,26 % de las cepas de mohos aisladas) en productos derivados de fruta (zumos, pulpas y néctares), y afirman que el índice de contaminación por mohos de los zumos y pulpas de melocotón ascendían al 64,51 % de las muestras. Los autores de ambos trabajos coinciden al afirmar que el género *Aspergillus* fue el que presentó una mayor incidencia en zumos y pulpas de melocotón.

La presencia de mohos en el producto acabado indica, normalmente, la utilización de materia prima muy contaminada, lo que impide que la población inicial sea totalmente eliminada por los tratamientos térmicos que se realizan durante la elaboración del cremogenado, o también puede ser debida a contaminaciones durante el proceso productivo (Dragoni y Comi, 1985).

4.4 Levaduras

Se han identificado un total de 24 cepas de levaduras siguiendo las claves propuestas por Deak y Beuchat (1987) y las características recogidas por Kreger-van Rij (1984).

Las levaduras, tal y como se muestra en la [Tabla 5-11](#) y en la [Tabla 5-12](#), son muy poco importantes numéricamente en la fruta triturada. Se han detectado únicamente en el 14,3 % de las muestras, aislándose 2 cepas, que tras las pruebas identificativas se han clasificado como pertenecientes a las especies *Cryptococcus laurentii* y *Kloeckera apiculata*. Tras los tratamientos térmicos realizados durante la elaboración del cremogenado, la población de levaduras ha sufrido un fuerte retroceso, por lo que en el producto acabado tan solo se han detectado en el 5 % de las muestras. Se han aislado un total de 12 cepas pertenecientes a las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir* y *Candida coliculosa*. Destaca el hecho de que 8 de las 12 cepas aisladas han sido identificadas como *Candida kefir* ([Tabla 5-12](#)).

En las muestras de producto alterado, las levaduras han estado presentes en el 100 % de las muestras y las 10 cepas aisladas han sido identificadas como pertenecientes a las especies *Candida magnoliae*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kloeckera apiculata*. La levadura mayoritaria ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, de la que se han identificado 7 cepas.

La presencia de levaduras en el cremogenado de melocotón era presumible ya que, además de formar parte de la microflora natural de las frutas (Deak y Beuchat, 1987; Torok y King, 1991a), son microorganismos que se adaptan con facilidad a los medios ácidos y crecen bien por debajo de valores de pH 4. Son citadas por algunos autores (Corlett y Brown, 1983) como los microorganismos más marcadamente ácido-tolerantes que se han encontrado en

alimentos. Como ejemplo mencionar que puede crecer a valores de pH de 2,35 y algunas especies de *Saccharomyces* pueden hacerlo a pH de hasta 1,5.

Todas las especies que se han aislado en el presente trabajo se encuentran dentro de la relación de levaduras que componen la población habitual de bebidas no alcohólicas, integrada por unas 60 ó 70 especies diferentes (Sand y Grizsvén, 1976; Beuchat, 1978; Berry, 1979). En un estudio sobre la microbiología de zumos y néctares de frutas, Dragoni y Comi (1985) obtuvieron recuentos de levaduras inferiores a 10^2 pfc/ml en el 40 % de las muestras, y aislaron 17 especies distintas pertenecientes a 9 géneros. Las especies más representativas fueron: *Kloeckera apiculata*, *Pichia etchellsii*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis haemulonii* y *Candida guilliermondii*. Sin embargo, no detectaron la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que por otros autores es citada como una de las especies más frecuentemente aislada en frutas (Torok y King, 1991a), y en zumos y concentrados de frutas (Turtura *et al.*, 1988; Deak y Beuchat, 1993).

5 Microflora potencialmente alterante del cremogenado

Las bacterias que pueden presentar una aptitud idónea para desarrollarse con los valores de pH que presentan las muestras de cremogenado de melocotón analizadas son muy pocas; tan sólo las bacterias lácticas pueden considerarse capaces de sobrevivir y desarrollarse en tales condiciones (Corlett y Brown, 1983). Su preferencia por medios con pH ácidos, su facultad para desarrollarse de forma satisfactoria en ausencia de aire (soportan bien concentraciones de oxígeno disuelto como las que se presentan en los tanques de almacenamiento de cremogenado) y la existencia de especies psicrófilas que crecen bien a temperaturas bajas (Kooiman, 1977), convierte a las bacterias lácticas en potenciales alterantes de zumos y cremogenados (Vaughn *et al.*, 1957).

Los resultados del análisis de las 5 muestras de producto alterado ([Tabla 5-11](#)) parecen confirmar lo dicho anteriormente, ya que no se ha detectado la presencia en estas muestras de bacilos esporulados ni de cocos Gram positivos y, sin embargo, sí se ha confirmado la presencia de bacterias lácticas en el 100% de las muestras. Esto podría llevar a considerar que estas bacterias pueden ser las responsables de la alteración del cremogenado. No obstante, un estudio más detallado de las muestras hace descartar esta suposición debido a que aunque las bacterias lácticas son productoras de alteraciones, su bajo número presente imposibilita que sean capaces de producir las alteraciones suficientes como para destruir completamente la estructura del cremogenado en las condiciones normales de almacenamiento.

Los mohos, principalmente los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, también son microorganismos capaces de alterar un producto como el cremogenado de melocotón. De los resultados obtenidos en los recuentos y las identificaciones se desprende una presencia relativamente elevada de mohos en las muestras de producto acabado. Sin embargo, su característica general de ser microorganismos con un metabolismo eminentemente aerobio, unido a las técnicas utilizadas en el proceso de elaboración del cremogenado, durante el cual el producto es desaireado, y a la forma de almacenamiento del producto, en atmósfera de nitrógeno, que impiden su crecimiento, obligan a descartar a los mohos como posibles causantes de alteraciones graves en cremogenado de melocotón. Además, la ausencia de mohos en la totalidad de las muestras de producto alterado estudiadas, apoya la teoría de que los mohos no constituyen un riesgo serio como grupo potencialmente alterante del cremogenado de melocotón.

De la bibliografía se deduce que las levaduras son los microorganismos más adaptados para desarrollarse en las condiciones que presentan los zumos y derivados de fruta,

y por lo tanto también son citadas como los principales alterantes de estos productos (Muller, 1981; Beuchat, 1982a; Corlett y Brown, 1983).

Los recuentos de levaduras obtenidos en las muestras de cremogenado de melocotón alterado han sido en todos los casos superiores a 10^4 pfc/g, valores mucho más elevados que los encontrados en fruta triturada y producto acabado.

La población microbiana de estas muestras de producto alterado ha estado dominada por la presencia de levaduras, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que concuerda con la hipótesis planteada por Corlett y Brown (1983) de que en los alimentos ácidos, las levaduras que se encuentran dentro de una población microbiana heterogénea, acaba por desplazar a las bacterias.

Los resultados de los aislamientos obtenidos en las muestras de cremogenado alterado demuestran claramente que la alteración del cremogenado está ocasionada por levaduras, sin embargo resulta difícil determinar dónde se encuentra el origen de dicha alteración ya que las levaduras aisladas (*Saccharomyces cerevisiae* principalmente) pueden proceder del medio ambiente (Turtura y Massa, 1987), de los frutos utilizados en la elaboración del cremogenado (Walker y Ayres, 1970), o de cualquier otro material vegetal (Turtura y Samaja, 1978), por lo que las posibles causas de la alteración pueden ser numerosas. *Saccharomyces cerevisiae* es una especie especialmente relacionada con alteraciones en productos derivados de frutas, especialmente zumos y cremogenados (Stecchini y Beuchat, 1985; Jermini *et al.*, 1987; Deak y Beuchat, 1987). Algunos autores (Turtura y Massa, 1987; Turtura *et al.*, 1988) tras investigar diversos casos de alteración de zumos de fruta envasada en "tetra brick", afirman que *Saccharomyces cerevisiae* es la responsable directa de alteraciones producidas en néctares de naranja, así como en zumos y pulpas de pera y de melocotón. Esta levadura fermenta la glucosa, la maltosa y la sacarosa de los zumos y cremogenados produciendo alcohol y CO₂ que provocaba el hinchamiento de los recipientes que los contienen. Deak y Beuchat (1993) detectaron la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en el 100 % de las muestras de zumo de naranja alterado que estudiaron.

La mencionada aptitud de *Saccharomyces cerevisiae* para desarrollarse en las condiciones de hábitat que presenta el cremogenado de melocotón, junto con su relativamente elevada termorresistencia (Put y De Jong, 1980) hacen que sea una de las especies con un potencial alterante más alto.

6 Confirmación del carácter potencialmente alterante de las levaduras

Con el fin de confirmar el carácter alterante de las levaduras aisladas en las muestras de cremogenado estudiadas se realizó la experiencia descrita con detalle en Material y Métodos (apartado). Se ensayaron cada una de las 24 cepas de levadura previamente aisladas e identificadas ([Tabla 5-12](#)). Para ello se inoculó cremogenado de melocotón estéril con cada una de las distintas cepas de levadura y se incubaron a 2 °C y 28 °C durante 45 días.

Las tablas siguientes muestran los resultados obtenidos a las temperaturas de incubación de 2 °C y 28 °C respectivamente.

Cepa	Días de incubación									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	
<i>Candida kefir</i>										
15	-	-		+	+	+	+	+	+	
16	-	-		+	+	+	+	+	+	
19	-	-		+	+	+	+	++	++	
24	-	-		+	+	+	+	+	+	
25	-	-	-			+	++	++	++	
31	-	-		+	+	+	+	+	+	
37	-	-	-	-		+	+	+	+	
38	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Kloeckera apiculata</i>										
51	-	-			+	+	+	+	+	
203	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
206	-	-	-	-	-					
<i>Cryptococcus laurentii</i>										
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Candida magnoliae</i>										
91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>										
26	-	-	+	+	++	++	++	++	++	
27	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
99	-	-	+	++	++	++	++	++	++	
100	-	-			++	++	++	++	++	
201	-	-	-	-	++	++	++	++	++	
202	-	-	+	++	++	++	++	++	++	
204	-	-	-							
205	-	-				+	++	++	++	
<i>Candida coliculosa</i>										
215	-	-	-		+	++	++	++	++	
216	-	-	-		+	++	++	++	++	

Resultados de la prueba confirmativa del carácter alterante de las levaduras incubadas a 2 °C.

- ausencia de gas.

resultado variable.

+ presencia de gas en las campanas Durham pero con ausencia de burbujas visibles en el cremogenado.

++ producción vigorosa de gas con formación de burbujas visibles en el cremogenado.

Cepa	Días de incubación									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	
<i>Candida kefir</i>										
15	-			+	+	+	+	+	+	
16				+	+	+	+	+	+	
19		+	+	+	++	++	++	++	++	
24					++	++	++	++	++	
25					++	++	++	++	++	
31	-			+	+	+	+	+	+	
37	-		+	+	++	++	++	++	++	
38	-			+	++	++	++	++	++	
<i>Kloeckera apiculata</i>										
51	-				+	+	+	++	++	
203	-		++	++	++	++	++	++	++	
206					+	+	++	++	++	
<i>Cryptococcus laurentii</i>										
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Candida magnoliae</i>										
91	-		++	++	++	++	++	++	++	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>										
26	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
92				+	++	++	++	++	++	
99	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
100		++	++	++	++	++	++	++	++	
201		++	++	++	++	++	++	++	++	
202			++	++	++	++	++	++	++	
204		++	++	++	++	++	++	++	++	
205	+	+	+	+	++	++	++	++	++	
<i>Candida coliculosa</i>										
215		+	++	++	++	++	++	++	++	
216				+	++	++	++	++	++	

Resultados de la prueba confirmativa del carácter alterante de las levaduras incubadas a 28°C.

- ausencia de gas.

resultado variable.

+ presencia de gas en las campanas Durham pero con ausencia de burbujas visibles en el cremogenado.

++ producción vigorosa de gas con formación de burbujas visibles en el cremogenado.

De los resultados se deduce que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han sido las que han fermentado el cremogenado de forma más rápida y vigorosa, con una gran producción de CO₂ que ha provocado la formación de burbujas visibles en el seno del cremogenado. A los 25 días de incubación a 2 °C la mayoría de estas cepas han presentado una fermentación vigorosa y al finalizar el período de incubación (45 días) todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, salvo la cepa 92, han mostrado capacidad para fermentar el cremogenado. Como era previsible, la fermentación del cremogenado por estas mismas cepas se ha producido de forma mucho más rápida al ser incubadas a 28 °C. En este caso, a los 5 días de incubación ya se apreciaba fermentación vigorosa, con formación de burbujas visibles en el seno del cremogenado, en algunas de las cepas, y a los 10 días de incubación la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentaban este aspecto y en todas ellas se

apreciaba producción de gas. Otras especies como *Candida kefir* también han producido fermentaciones, con producción de CO₂, pero de forma más débil y más lenta que *Saccharomyces cerevisiae*, si bien hay que señalar el hecho de que todas las cepas de esta especie fueron capaces de fermentar el cremogenado tanto a 2 °C como a 28 °C. Las cepas de *Kloeckera apiculata* han presentado, en líneas generales, un comportamiento similar al de *Candida kefir*, siendo capaces de fermentar el cremogenado de melocotón en todos los casos, aunque a la temperatura de 2 °C el inicio de la fermentación ha sido más tardío, ya que dos de las tres cepas de esta especie no han mostrado signos de fermentación hasta los 30 días de incubación. *Candida magnoliae* no ha producido ninguna alteración a 2 °C, sin embargo a 28 °C se ha observado una fermentación bastante rápida de forma que a los 10 días de incubación ya se advertía producción de gas, acumulado en las campanas Durham, y a los 15 días la fermentación era vigorosa con formación de burbujas visibles de gas en el seno del cremogenado.

Las dos cepas de *Candida coliculosa* estudiadas también han resultado poseer una alta capacidad para fermentar el cremogenado. Así, a 2 °C se observaron signos de alteración a los 20 días, y a 28 °C la alteración se adelantó a los 5 días. En las pruebas realizadas con *Criptococcus laurentii* no se ha observado la alteración del cremogenado de melocotón en ninguna de las dos temperaturas ensayadas.

La temperatura ha tenido una clara influencia sobre la velocidad con que las levaduras ensayadas han fermentado el cremogenado. Se ha observado que a 2 °C se produce un retardo en el inicio de la alteración para todas las cepas ensayadas. Así, en la prueba realizada a 2 °C en ninguna de las cepas ensayadas se han observado signos de alteración antes de los 15 días de incubación, mientras que las mismas cepas incubadas a 28 °C, a los 5 días ya habían fermentado el cremogenado con gran producción de CO₂ y la formación de burbujas en el medio de cultivo.

Si se considera que la única especie que se ha aislado de todas las muestras de cremogenado alterado ha sido *Saccharomyces cerevisiae* y que esta especie ha sido la que ha mostrado una mayor capacidad de fermentación de todas las ensayadas, se puede afirmar que esta especie es la que supone un mayor riesgo como posible alterante de cremogenado de melocotón.

7 Cinéticas de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* durante el almacenamiento de cremogenado de melocotón

Puesto que los resultados han señalado a la especie *Saccharomyces cerevisiae* como el microorganismo con un potencial alterante más elevado de cuantos se han aislado en cremogenado de melocotón, se ha querido estudiar el comportamiento de esta especie durante el almacenamiento del cremogenado. Para ello se ha realizado la experiencia descrita en Material y Métodos (2.3.7.6), y se han analizado los tres parámetros siguientes:

- Crecimiento de las levaduras mediante recuento de viables.
- Variación del contenido de azúcares en el cremogenado.
- Evolución del pH del cremogenado.

Para la realización de esta prueba se han seleccionado tres de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que han demostrado una mayor capacidad de fermentación del cremogenado.

7.1 Identificación de las cepas de levadura utilizadas

Para confirmar la identificación de las tres cepas seleccionadas, previamente

identificadas en nuestro laboratorio como *Saccharomyces cerevisiae*, se han enviado a los laboratorios Centraalbureau voor Schimmelcultures de Delft, Holanda.

Los resultados de los análisis han confirmado que las tres cepas pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen.

7.2 Modelización del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Con el fin de modelizar las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de melocotón se han ajustado los valores experimentales de los recuentos de viables obtenidos mediante el seguimiento de la población durante 140 días de incubación, a la ecuación de Gompertz. En el caso de la cepa 204 inoculada con una concentración inicial de 1000 microorganismos/ml e incubada a una temperatura de 15 °C, el seguimiento del crecimiento solamente se ha realizado durante 56 días de incubación ya que su crecimiento ha sido muy rápido, alcanzando en tan sólo 7 días de incubación densidades de población del orden de 10^8 pfc/ml.

De la Figura 5-13 a la Figura 5-24 se relacionan las distintas curvas de crecimiento para cada una de las tres cepas de levadura, en las diferentes condiciones de concentración inicial de microorganismos y temperatura de incubación estudiadas.

[Figura 5-13](#)

[Figura 5-14](#)

[Figura 5-15](#)

[Figura 5-16](#)

[Figura 5-17](#)

[Figura 5-18](#)

[Figura 5-19](#)

[Figura 5-20](#)

[Figura 5-21](#)

[Figura 5-22](#)

[Figura 5-23](#)

[Figura 5-24](#)

En la Tabla siguiente se relacionan los parámetros cinéticos C, B y M de la ecuación de Gompertz que se han obtenido al ajustar los mencionados valores experimentales de los recuentos de viables para el crecimiento de las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas. El cuarto parámetro, A, de esta ecuación corresponde al logaritmo de la concentración inicial de microorganismos. Este parámetro ha quedado previamente predeterminado, ya que en todas las pruebas realizadas con las cepas de levadura ensayadas, el cremogenado de melocotón ha sido inoculado hasta obtener concentraciones iniciales de 10 y 1000 microorganismos/ml.

Cepa	T (°C)	Número inicial de microorganismos/ml	Parámetros de Gompertz				r ²
			A	C	B	M	
26	5	10	1	5,32 0,13	0,37 0,04	4,69 0,19	0,9852
26	5	1000	3	3,35 0,17	0,66 0,23	2,8 0,4	0,9828
26	15	10	1	6,20 0,09	2,9 0,4	0,41 0,04	0,9508
26	15	1000	3	4,77 0,09	3,1 0,4	0,3 0,3	0,9768
99	5	10	1	5,18 0,13	0,44 0,06	3,54 0,23	0,9649
99	5	1000	3	2,97 0,09	0,56 0,12	2,6 0,3	0,9167
99	15	10	1	6,51 0,09	1,9 0,3	0,55 0,05	0,9677
99	15	1000	3	4,65 0,06	2,6 0,3	0,43 0,03	0,9880
204	5	10	1	6,4 0,1	0,91 0,13	1,45 0,13	0,9624
204	5	1000	3	4,39 0,07	0,83 0,11	1,19 0,13	0,9594
204	15	10	1	6,21 0,06	2,39 0,25	0,49 0,03	0,9808
204	15	1000	3	5,02 0,15	3,7 0,5	0,38 0,03	0,9881

Parámetros de la ecuación de Gompertz para el crecimiento de tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en cremogénado de melocotón a distintas temperaturas y concentraciones iniciales de microorganismos.

A = logaritmo decimal del número de microorganismos inicial log(pfc/ml).

C = logaritmo decimal del incremento final de microorganismos log(pfc/ml).

M = tiempo al cual el cultivo alcanza su máximo ratio de crecimiento semanas.

B = ratio de crecimiento relativo a M log(pfc/ml)/semanas.

En todos los casos tanto los ajustes como los estimados de los parámetros de la ecuación de Gompertz han resultado significativos en un nivel de confianza del 95%. Los coeficientes de determinación (r^2) de los ajustes han sido, en todos los casos, superiores a 0,950, salvo cuando la cepa 99 con una concentración inicial de 1000 microorganismos/ml ha sido incubada a 5 °C, donde el coeficiente de determinación obtenido ha sido ligeramente inferior con un valor de 0,916.

En general, se ha observado en todas las cepas, independientemente de la concentración inicial de microorganismos, una marcada influencia de la temperatura de incubación sobre la forma de las curvas de crecimiento. Esta influencia se hace especialmente patente sobre los parámetros B (ratio de crecimiento relativo máximo) y M (tiempo al cual se alcanza el ratio de crecimiento máximo) de la ecuación de Gompertz, si bien el resultado es claramente distinto en cada uno de ellos de forma que mientras B aumenta con la temperatura de incubación, M disminuye. En algunos casos, el ratio de crecimiento relativo máximo, B, puede llegar a aumentar hasta 8 veces cuando la temperatura de incubación pasa de 5 °C a 15 °C, manteniendo inalteradas el resto de condiciones. Por su parte el tiempo necesario para alcanzar dicho ratio, M, puede llegar a disminuir más de 11 veces con la misma variación de temperatura.

Se ha observado que la concentración inicial de microorganismos también ejerce una cierta influencia sobre los parámetros B y M de la curva de crecimiento en el mismo sentido que la temperatura, aunque su efecto es mucho más débil. A excepción de la cepa 204 cuando ha sido incubada a 5 °C, en todas las demás pruebas, el parámetro B aumenta al aumentar la concentración inicial de microorganismos, aunque este aumento nunca llega a ser superior a 1,8 veces. El parámetro M disminuye en todos los casos al aumentar la concentración inicial de microorganismos, pero, como ocurre con parámetro B, nunca llega a disminuir más de 1,8 veces.

Con el fin de ampliar el conocimiento acerca de las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en la tabla siguiente se muestran los siguientes valores cinéticos derivados de los parámetros de la ecuación de Gompertz: ratio de crecimiento exponencial (RCE), tiempo de generación (TG), densidad máxima de población (DMG) y fase de latencia (FL). Además se ha evaluado, la influencia de la temperatura y de la carga microbiana inicial en el grado de desarrollo de las levaduras y, por tanto en el nivel de alteración del cremogenado de melocotón.

Cepa	T (°C)	Número inicial de microorganismos/ml	RCE [log (pfc/ml)/semanas]	TG (semanas)	FL (semanas)	DMP [log(pfc/ml)]
26	5	10	0,7206	0,4177	1,9680	6,3240
26	5	1000	0,7971	0,3776	1,2808	6,3532
26	15	10	6,6551	0,0452	0,0722	7,1965
26	15	1000	5,5107	0,0546	0,0355	7,7740
99	5	10	0,8406	0,3581	1,2693	6,1807
99	5	1000	0,6109	0,4928	0,8598	5,9733
99	15	10	4,4456	0,0677	0,0120	7,5093
99	15	1000	4,4625	0,0675	0,0464	7,6509
204	5	10	2,1370	0,1409	0,3545	7,3844
204	5	1000	1,3427	0,2242	-0,0175	7,3922
204	15	10	5,4645	0,0551	0,0759	7,2095
204	15	1000	6,7619	0,0445	0,1084	8,0231

Valores cinéticos de crecimiento derivados de los parámetros de la ecuación de Gompertz para el crecimiento de tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en cremogenado de melocotón a distintas temperaturas y concentraciones iniciales.

RCE: ratio de crecimiento exponencial = BC/e [log (pfc/ml)/semanas].

TG: tiempo de generación = $(\log 2)/BC$ [semanas].

FL: fase de latencia = $M-(1/B)$ [semanas].

DMP: densidad máxima de población = $A + C$ [log (pfc/ml)].

Un análisis comparativo más detallado de las curvas de crecimiento y de sus parámetros permite visualizar de forma clara y concisa la influencia que la temperatura ejerce sobre el crecimiento de esta especie. Resulta fácil observar las diferentes formas que presentan las curvas de crecimiento cuando, para una misma concentración inicial de microorganismos, la misma cepa ha sido incubada a 5 °C y a 15 °C.

Cuando la temperatura de incubación es de 5 °C la curva de crecimiento presenta una forma típica, con una fase de latencia, de duración variable en función de la cepa, seguida de una fase de crecimiento exponencial que se prolonga durante varias semanas hasta que se alcanza la densidad máxima de población (DMP). A partir de entonces, el crecimiento entra en una fase estacionaria durante la cual la población de levaduras se mantiene estable o, en algunos casos desciende ligeramente. Por el contrario, cuando la temperatura de incubación aumenta a 15 °C, manteniendo el resto de condiciones inalteradas, la curva de crecimiento cambia considerablemente su aspecto y sus parámetros cinéticos. La duración de la fase de latencia se reduce notablemente, llegando a pasar de una duración superior a una semana, para una temperatura de incubación de 5 °C, a tan sólo algunas horas cuando la temperatura de incubación aumenta hasta los 15 °C. La fase de crecimiento exponencial tiene una duración mucho más reducida, y la curva presenta una pendiente mucho más acusada, de forma que el tiempo que tarda en alcanzarse la densidad de población máxima se reduce de forma espectacular.

Al analizar la influencia de la temperatura sobre cada uno de los parámetros derivados de la ecuación de Gompertz se observa que es similar en las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ensayadas. Así, el ratio de crecimiento exponencial (RCE) ha resultado ser siempre mucho mayor cuando la temperatura de incubación es de 15 °C (casi 10 veces mayor en el caso de la cepa 26, con una concentración inicial de 10 microorganismos/ml). El tiempo de generación (TG) también se ha visto influenciado por la temperatura, de manera que en todas las experiencias realizadas a 15 °C ha tomado valores notablemente inferiores a aquellos que se han alcanzado a 5 °C. El caso más notable se ha dado también para la cepa 26 a una concentración inicial de 10 microorganismos/ml, con un tiempo de generación a 5°C de 0,417 semanas (casi 3 días), frente a un tiempo de generación de 0,0452 semanas (apenas siete horas y media) para una temperatura de incubación de 15 °C. La densidad máxima de población también se ha visto afectada por la temperatura, de modo que la concentración final de la levadura que se alcanza en cremogenado aumenta siempre al aumentar la temperatura. En algunos casos estas concentraciones han variado, para una misma cepa y concentración inicial, desde $10^{5,97}$ ó $9,4 \cdot 10^5$ hasta $10^{7,65}$ ó $4,4 \cdot 10^6$ pfc/ml. Pero el parámetro sobre el que la influencia de la temperatura ha sido más sobresaliente ha sido la fase de latencia (FL), cuya duración se ha visto reducida, en algunos casos, en más de 100 veces, pasando de durar 1,269 semanas (casi 9 días) a 0,012 semanas (apenas 2 horas).

La influencia de la concentración inicial sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* ha resultado mucho menos evidente que la de la temperatura, no obstante se han observado algunas tendencias de tipo general influidas por esta variable. Si bien el parámetro B de la ecuación de Gompertz ha presentado siempre valores mayores a mayor concentración inicial de microorganismos, salvo para la cepa 204 incubada a 5 °C, esta diferencia no ha sido nunca superior en 1,8 veces. Esto indica que el crecimiento ha sido más rápido cuando la concentración inicial es mayor. El tiempo que tarda una población en alcanzar su máximo ratio de crecimiento, parámetro M de la ecuación de Gompertz, ha seguido una relación inversa con la concentración, tomando valores menores a mayores concentraciones iniciales.

Al contrario de lo observado en los parámetros de la ecuación de Gompertz, no se ha observado una influencia clara de la concentración inicial de microorganismos, por lo que no es posible aseverar de forma concluyente su efecto sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Al comparar el comportamiento de las tres cepas entre sí no es posible afirmar que existan diferencias entre el crecimiento de cada una de ellas, ya que tanto las curvas de crecimiento, como los parámetros cinéticos derivados han dado resultados similares para todas ellas.

7.3 Variación del contenido en sólidos solubles y del pH

El crecimiento de microorganismos, como las levaduras, en cremogenados de melocotón, produce alteraciones en su composición y características organolépticas que deprecian su calidad. Una de las principales alteraciones que tienen lugar como consecuencia del desarrollo de levaduras es la producción de CO₂ y alcohol como resultado de la fermentación de los azúcares.

Con el fin de evaluar el alcance de estas alteraciones y de establecer una relación entre la dinámica poblacional de las levaduras y el consumo de los azúcares por parte de éstas, se ha estudiado la forma y los parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, y también se ha realizado un seguimiento de la evolución del contenido en sólidos solubles y del pH del cremogenado. Con este fin, se han llevado a cabo experiencias inoculando cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de

melocotón y, simultáneamente a los recuentos microbianos, se han tomado medidas del pH y del contenido de azúcares.

Los resultados obtenidos se reflejan en las figuras que se incluyen en este apartado (Figura 5-25 a la Figura 5-36), donde se representa la evolución de la población microbiana, del pH y del contenido en azúcares frente al tiempo, para cada una de las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas experiencias se han llevado a cabo bajo diferentes condiciones de temperatura y concentraciones iniciales de microorganismos.

[Figura 5-25](#)

[Figura 5-26](#)

[Figura 5-27](#)

[Figura 5-28](#)

[Figura 5-29](#)

[Figura 5-30](#)

[Figura 5-31](#)

[Figura 5-32](#)

[Figura 5-33](#)

[Figura 5-34](#)

[Figura 5-35](#)

[Figura 5-36](#)

En general, del análisis de estas figuras, resulta que las tres cepas presentan comportamientos bastante similares cuando son incubadas bajo las mismas condiciones experimentales.

El contenido en sólidos solubles o azúcares presenta, en todos los casos, una evolución que se encuentra directamente relacionada con la curva de crecimiento de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* correspondiente. Así, cuanto más rápido es el aumento de la población de levaduras, tanto más rápido es el consumo de azúcares.

Al estar, pues, el contenido de azúcares ligado al crecimiento de las levaduras, resulta evidente que las variables temperatura y concentración inicial de microorganismos influirán sobre la evolución del contenido en azúcares de una forma similar a como lo hace sobre la población microbiana. Es por esto que las curvas de contenido en azúcares muestran formas bien distintas en función de la temperatura a la que han sido realizadas las distintas experiencias. Parece, sin embargo, que es necesario que se supere un cierto nivel de población mínimo para que el contenido en azúcares comience a reducirse de forma rápida. Esto resulta más patente al analizar los resultados obtenidos en las experiencias realizadas a 5 °C (ver figuras adjuntas en este apartado), donde es fácil observar cómo durante los primeros días de incubación el contenido en azúcares se mantiene casi constante, con un ligero descenso, hasta que la concentración de levaduras en el cremogenado alcanza unos valores por encima de 10^6 pfc/ml, y es cuando se aproxima a 10^7 pfc/ml cuando la curva de contenido en azúcares sufre un descenso realmente extraordinario.

Cuando el cremogenado de melocotón ha sido almacenado a 15 °C se observa, en todos los casos, un rápido descenso del contenido en azúcares, hasta que se alcanza un valor en torno a los 5 °Brix a partir del cual se mantiene constante hasta el final del tiempo de almacenamiento. Este valor ha resultado ser el mismo para las tres cepas estudiadas, no apreciándose reducciones por debajo de este valor en ninguna de las experiencias realizadas. El tiempo empleado por las levaduras para reducir el contenido de azúcares hasta este valor ha oscilado entre los 15 y los 50 días, según las distintas cepas.

La influencia de la concentración inicial de microorganismos en la evolución de los azúcares ha sido, al igual de lo que ocurría en las curvas de crecimiento, mucho menos significativa, aunque sí que se ha observado, especialmente en las experiencias realizadas a

15 °C, que el contenido en azúcares ha alcanzado su valor mínimo con mayor rapidez en aquellos casos en que la concentración inicial era de 1000 pfc/ml.

El pH del cremogenado de melocotón apenas sufre modificación alguna por el efecto del crecimiento de las levaduras, manteniéndose prácticamente constante durante todo el periodo de almacenamiento, con pequeñas oscilaciones en torno al valor inicial, pH 3,87, que fluctúan entre 3,6 y 4,1.

Al comparar las distintas cepas entre sí, no se han observado diferencias apreciables entre ellas, salvo en la cepa 204 cuando se ha incubado a 5 °C, que ha mostrado un consumo más rápido de los azúcares contenidos en el cremogenado de melocotón que las otras dos cepas. Esta cepa ha alcanzado el valor mínimo de contenido en azúcares a los 60-70 días de incubación, mientras que las otras dos cepas lo han hecho al final del periodo de almacenamiento (140 días). La cepa 204 inoculada con una concentración inicial de 1000 microorganismos/ml e incubada a una temperatura de 15 °C, ha presentado un crecimiento muy rápido que se traduce en un descenso también rápido del contenido de azúcares. Este rápido crecimiento ha provocado una pronta estabilización de los distintos parámetros objeto de estudio, por lo que su seguimiento se ha realizado tan sólo durante 56 días de incubación, y no durante 140 días como en el resto de las experiencias llevadas a cabo.

8 Cinéticas de destrucción térmica de *Saccharomyces cerevisiae*

Tal y como ya se ha señalado, el cremogenado de melocotón es un producto altamente susceptible de sufrir alteraciones microbiológicas, especialmente debidas al desarrollo de levaduras fermentadoras. El método más utilizado por las industrias productoras de derivados de frutas para evitar el posible desarrollo de estos microorganismos alterantes, y con ello sus efectos perjudiciales, es la pasteurización del producto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es la especie *Saccharomyces cerevisiae* la que presenta un potencial alterante más alto en las condiciones normales de composición y almacenamiento que presenta el cremogenado.

Debido a las razones anteriores, y con el fin de determinar las cinéticas de destrucción térmica del representante microbiano potencialmente más alterante del cremogenado, se han realizado una serie de experiencias de termorresistencia con las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de cremogenado de melocotón que, en las pruebas de alteración, presentaron un potencial alterante más alto.

8.1 Tiempo de reducción decimal (Dt)

A partir de los resultados experimentales de los recuentos de supervivencia celular, que se han obtenido después de los tratamientos térmicos realizados con las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, se han calculado los distintos tiempos de reducción decimal (D). De forma general, se asume que las curvas de destrucción térmica siguen, con el tiempo, una exponencial decreciente. Por consiguiente solamente la fase de destrucción exponencial puede ser usada para determinar con exactitud el tiempo de destrucción térmica (Russel, 1971; King *et al.*, 1979). En algunos de los experimentos que se han llevado a cabo durante esta investigación se ha observado que, durante los primeros momentos del tratamiento térmico, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ensayadas no han seguido una cinética de primer orden, sino que las curvas de destrucción térmica han presentado trayectos con formas de "hombros" o "colas". Este comportamiento puede ser debido a fenómenos de agregaciones y desagregaciones celulares, típicas en los tratamientos de células vegetativas, de tal forma que la curva de supervivencia puede presentar diferentes pendientes antes de adquirir la

cinética ideal de muerte o destrucción térmica (Menegazzi y Ingledew, 1980; Tsang y Ingledew, 1982).

A continuación se exponen los resultados de los tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los ajustes y los parámetros estimados de todas las regresiones que se han realizado han resultado significativos con un nivel de confianza del 95 %.

8.1.1 Cepa 26

La [Figura 5-37](#) y [Figura 5-38](#) corresponden a los estudios realizados con la cepa 26 y en ellas se representa el logaritmo de los valores experimentales de los recuentos de supervivientes obtenidos para la inactivación térmica frente al tiempo, así como las rectas resultantes del ajuste de dichos valores experimentales a una cinética de primer orden linealizada. Estos estudios se han realizado a diferentes temperaturas de tratamiento y utilizando como medio de tratamiento tampón McIlvaine a pH 7 y 4. La [Figura 5-39](#) muestra los resultados obtenidos para la inactivación térmica para la misma cepa utilizando cremogenado de melocotón como menstruo de tratamiento.

En la tabla siguiente se detallan los parámetros cinéticos resultantes de los ajustes de los datos experimentales para la cepa 26, así como los tiempos de reducción decimal, o valores D_t , para cada una de las temperaturas ensayadas en los distintos medios de tratamiento. Como puede observarse en esta tabla, en todos los casos, el coeficiente de determinación (r^2) ha sido superior a 0,95.

Medio de tratamiento	Temperatura de tratamiento (°C)	A	B	r^2	D (min)
	58,1	3,95 ± 0,07	0,315 ± 0,015	0,996	3,17 ± 0,15
Tampón	59,8	4,0 ± 0,3	-1,00 ± 0,17	0,965	1,00 ± 0,17
McIlvaine pH 7	61,8	3,97 ± 0,22	-2,8 ± 0,4	0,959	0,36 ± 0,05
	64,0	4,69 ± 0,12	-10,3 ± 1,0	0,976	0,097 ± 0,009
	58,0	4,01 ± 0,24	-0,23 ± 0,04	0,946	4,4 ± 0,7
Tampón	60,0	3,93 ± 0,18	-0,86 ± 0,09	0,980	1,16 ± 0,12
McIlvaine pH 4	62,0	4,45 ± 0,08	-4,6 ± 0,4	0,985	0,220 ± 0,019
	64,0	4,4 ± 0,3	-12,6 ± 2,0	0,961	0,080 ± 0,013
	58,0	3,48 ± 0,13	-0,34 ± 0,05	0,975	2,9 ± 0,4
Cremogenado de melocotón	59,9	3,50 ± 0,18	-1,44 ± 0,24	0,970	0,69 ± 0,12
	62,0	3,95 ± 0,22	-7,7 ± 1,1	0,986	0,130 ± 0,018
	64,0	4,3 ± 0,5	-22 ± 5	0,966	0,045 ± 0,010

Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los valores experimentales a las curvas de supervivencia ($\log(\text{supervivientes}) = A + B t$) para la cepa 26 de *Saccharomyces cerevisiae* para las diferentes temperaturas y medios de tratamiento.

Los tiempos de reducción decimal obtenidos en el rango de temperaturas estudiado (58 - 64 °C) varían desde 0,045 min, en cremogenado de melocotón a 64 °C, hasta 4,4 min, en tampón McIlvaine pH 4 a 58 °C. Además, se observa que a temperaturas de tratamiento bajas los tiempos de reducción decimal son mayores cuando el tratamiento térmico se realiza en tampón McIlvaine pH 4 (4,4 min a 58 °C y 1,16 min a 60 °C), mientras que cuando el tratamiento térmico se realiza en tampón McIlvaine pH 7 los valores alcanzados son menores

(3,17 min a 58,1 °C y 1,00 min a 59,8 °C). A temperaturas más elevadas el efecto es contrario siendo los tiempos de reducción decimal mayores cuando el medio de tratamiento es menos ácido.

Los tiempos de reducción decimal que se han alcanzado en cremogenado de melocotón, han sido, para todas las temperaturas, inferiores a los obtenidos cuando el tratamiento térmico se ha realizado en los tampones, lo cual indica que esta cepa ha resultado menos termorresistente en cremogenado de melocotón que en los tampones a pH 7 y pH 4. Esto puede deberse a un efecto del pH del medio de tratamiento, ya que el cremogenado de melocotón (pH = 3,87) es el más ácido de los tres.

8.1.2 Cepa 99

En la tabla siguiente se muestran los parámetros cinéticos de inactivación térmica resultantes de los ajustes de los datos experimentales para la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, así como los tiempos de reducción decimal, o valores D_t , para cada una de las temperaturas ensayadas en los distintos medios de tratamiento.

Medio de tratamiento	Temperatura de tratamiento (°C)	A	B	r^2	D (min)
Tampón McIlvaine pH 7	58,2	4,61 ± 0,23	-0,52 ± 0,08	0,974	1,9 ± 0,3
	60,0	4,2 ± 0,5	-0,76 ± 0,21	0,923	1,3 ± 0,4
	62,0	4,4 ± 0,3	-4,1 ± 0,9	0,979	0,24 ± 0,05
	63,8	4,9 ± 0,3	-13,2 ± 2,3	0,968	0,076 ± 0,013
Tampón McIlvaine pH 4	58,0	4,5 ± 0,3	-0,49 ± 0,08	0,958	2,1 ± 0,3
	60,0	4,37 ± 0,23	-1,36 ± 0,14	0,986	0,74 ± 0,08
	62,0	4,7 ± 0,5	-6,0 ± 1,7	0,972	0,17 ± 0,05
	64,1	4,9 ± 0,3	-21,8 ± 2,3	0,977	0,046 ± 0,005
Cremogenado de melocotón	58,1	4,2 ± 0,5	-1,3 ± 0,3	0,953	0,77 ± 0,18
	59,9	4,2 ± 0,7	-3,2 ± 1,2	0,914	0,31 ± 0,12
	62,0	5,0 ± 0,5	17 ± 3	0,973	0,059 ± 0,010

Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los valores experimentales a las curvas de supervivencia (\log supervivientes = A + B t) para la cepa 99 de *Saccharomyces cerevisiae* para las diferentes temperaturas y medios de tratamiento.

En este caso los coeficientes de determinación han resultado superiores a 0,95 salvo en los tratamientos realizados a 60 °C en tampón McIlvaine a pH 7 y en cremogenado de melocotón, donde ha tomado valores de 0,92 y 0,91 respectivamente.

Los tiempos de reducción decimal han variado desde 0,046 min, cuando la cepa ha sido tratada a 64 °C en tampón pH 4, hasta 2,1 min, cuando el tratamiento ha sido realizado a 58 °C en el mismo medio. Al comparar los resultados obtenidos en los distintos tratamientos con los tampones se observa que, a excepción de los tratamientos realizados a la temperatura más baja (58 °C), la cepa ha presentado una menor termorresistencia al ser tratada en tampón a pH 4, con tiempos de reducción decimal de 1,5 a casi 2 veces menores que los obtenidos a la misma temperatura en tampón pH 7. Sin embargo a 58 °C los tiempos de reducción decimal han sido prácticamente iguales en los dos medios de tratamiento.

Al igual que sucedía con la cepa 26 de *Saccharomyces cerevisiae*, cuando los tratamientos térmicos se han realizado en cremogenado de melocotón, se han obtenido en

todas las temperaturas ensayadas, unos tiempos de reducción decimal considerablemente menores que los obtenidos tanto en tampón pH 7 como en tampón pH 4. Así, tomando como ejemplo los valores D_{60} , éstos han sido 2,4 veces menores en cremogenado de melocotón que en tampón pH 4, y 4,2 veces menor que en tampón pH 7. Lo mismo puede aplicarse a las restantes temperaturas de tratamiento. En esta cepa no se muestran los datos referentes al tratamiento a 64 °C en cremogenado de melocotón, ya que la destrucción térmica a esta temperatura ha resultado demasiado rápida para obtener datos suficientemente fiables.

En la [Figura 5-40](#) y [Figura 5-41](#) se muestran los resultados obtenidos en las experiencias de inactivación térmica realizadas con la cepa 99 *Saccharomyces cerevisiae* de en los medios de tratamiento tampón McIlvaine a pH 7 y pH 4 respectivamente. En ellas se representan los logaritmos de los valores experimentales de los recuentos de supervivientes frente al tiempo, así como las rectas resultantes del ajuste de dichos valores experimentales a una cinética de primer orden linealizada. La [Figura 5-42](#) muestra los resultados obtenidos para la inactivación térmica para la misma cepa utilizando como menestruo de tratamiento cremogenado de melocotón.

Examinando estas figuras resulta indiscutible el efecto de la temperatura sobre la cinética de termodestrucción, ya que se observa claramente cómo las curvas de supervivencia adquieren una pendiente cada vez mayor a medida que aumenta la temperatura del tratamiento térmico.

8.1.3 Cepa 204

La tabla siguiente muestra los parámetros cinéticos de inactivación térmica resultantes de los ajustes de los datos experimentales para la cepa 204 de *Saccharomyces cerevisiae*, así como los tiempos de reducción decimal, o valores D_t , para cada una de las temperaturas ensayadas en los distintos medios de tratamiento. Los coeficientes de determinación (r^2) de todos los ajustes han resultado superiores a 0,95.

Medio de tratamiento	Temperatura de tratamiento (C)	A	B	r^2	D (min)
Tampón McIlvaine pH 7	56,0	3,62 ± 0,09	-0,40 ± 0,03	0,995	2,50 ± 0,19
	58,0	3,60 ± 0,10	-1,37 ± 0,22	0,976	0,73 ± 0,12
	62,0	4,20 ± 0,24	-27 ± 3	0,980	0,036 ± 0,004
	63,8	4,5 ± 0,7	-92 ± 8	0,950	0,011 ± 0,003
Tampón McIlvaine pH 4	55,8	3,70 ± 0,09	-0,29 ± 0,03	0,989	3,4 ± 0,4
	58,0	3,9 ± 0,3	-1,49 ± 0,23	0,975	0,67 ± 0,10
	60,0	4,3 ± 0,5	-6,5 ± 1,8	0,986	0,15 ± 0,04
	62,1	4,5 ± 0,3	-15,8 ± 2,4	0,968	0,063 ± 0,009
Cremogenado de melocotón	55,9	3,22 ± 0,08	-1,05 ± 0,10	0,992	0,95 ± 0,09
	57,9	3,72 ± 0,05	-5,51 ± 0,22	0,999	0,181 ± 0,007
	59,8	3,16 ± 0,23	-10,2 ± 2,4	0,967	0,098 ± 0,023
	61,8	3,3 ± 0,8	-38 ± 3	0,972	0,026 ± 0,003

Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los valores experimentales a las curvas de supervivencia ($\text{Log} [\text{supervivientes}] = A + B t$) para la cepa 204 de *Saccharomyces cerevisiae* para las diferentes temperaturas y medios de tratamiento.

El tiempo de reducción decimal más elevado, 3,4 min, se ha obtenido cuando la cepa

ha sido tratada en tampón pH 4 a la temperatura de tratamiento más baja, 56°C, mientras que el menor tiempo de reducción decimal ha correspondido al tratamiento realizado a 64 °C en medio tampón pH 7. Resulta difícil evaluar el efecto del pH de los tampones sobre la termorresistencia de esta cepa, ya que a algunas temperaturas de tratamiento la termorresistencia ha sido mayor en tampón pH 4 que en tampón pH 7, mientras que a otras el comportamiento de la cepa ha sido opuesto.

El comportamiento que ha mostrado la cepa 204 al ser tratada en cremogenado de melocotón ha sido similar al observado en las cepas anteriores, alcanzándose, en todos los casos, unos tiempos de reducción decimal inferiores a los obtenidos para las mismas temperaturas de tratamiento en tampones pH 7 y pH 4. Así, por ejemplo, los valores de D_{58} en cremogenado de melocotón ha sido de 0,18 min, frente a los 0,73 min alcanzados en tampón pH 7 o a los 0,67 min en tampón pH 4.

En la [Figura 5-43](#) y [Figura 5-44](#) se muestran los resultados obtenidos en las experiencias de inactivación térmica realizadas con la cepa 204 *Saccharomyces cerevisiae* en los medios de tratamiento tampón McIlvaine pH 7 y pH 4 respectivamente. En ellas se representan los logaritmos de los valores experimentales de los recuentos de supervivientes frente al tiempo de tratamiento, así como las rectas resultantes del ajuste de dichos valores experimentales a una cinética de primer orden linealizada.

La [Figura 5-45](#) muestra los resultados de inactivación térmica obtenidos para la misma cepa, utilizando como menstuo de tratamiento cremogenado de melocotón.

8.2 Valor z

Los valores z se han determinado mediante análisis de regresión de los valores D_t frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento térmico. En la [Tabla 5-20](#) se detallan los parámetros cinéticos de las curvas de destrucción térmica, así como los valores de z calculados para las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en cada uno de los medios de tratamiento estudiados.

Aunque al examinar los datos de la tabla se advierte que las cepas 26 y 99 tiene un comportamiento similar de manera que tanto la pendiente de la curva de destrucción térmica como los valores z calculados son mayores en cremogenado de melocotón y menores en tampón pH 7, al realizar un análisis de la varianza no se han encontrado diferencias significativas ($P < 0,01$) entre el tampón pH7, el tampón pH4 y el cremogenado de melocotón.

En la [Figura 5-46](#), [Figura 5-47](#) y [Figura 5-48](#) se representan los valores z frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento que se han calculado en los distintos medios para las cepas 26, 99 y 204 de *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente.

Cepa	Medio de tratamiento	Ordenada origen	Pendiente	r ²	z (°C)
26	Tampón pH 7	15,2 ± 0,9	-0,25 ± 0,06	0,998	4,0 ± 0,6
	Tampón pH 4	17,8 ± 1,2	-0,30 ± 0,06	0,991	3,3 ± 0,7
	Cremogenado,	18,3 ± 1,2	-0,31 ± 0,03	0,993	3,2 ± 0,5
99	Tampón pH 7	15,8 ± 0,9	-0,26 ± 0,12	0,958	3,85 ± 0,24
	Tampón pH 4	16,4 ± 0,3	-0,28 ± 0,04	0,995	3,57 ± 0,10
	Crernogenado	16,6 ± 0,5	-0,29 ± 0,11	0,985	3,45 ± 0,04
204	Tampón pH 7	17,6 ± 0,7	-0,306 ± 0,014	0,999	3,3 ± 0,3
	Tampón pH 4	16,09 ± 0,18	-0,28 ± 0,08	0,985	3,6 ± 0,9
	Cremogenado	9,33 ± 0,08	-0,17 ± 0,12	0,906	5,88 ± 0,03

Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los tiempos de reducción decimal a las curvas de destrucción térmica para tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en diferentes medios de tratamiento.

8.3 Influencia del Ph y del medio en la termorresistencia

Resulta difícil encontrar en la bibliografía datos sobre termorresistencia de levaduras a temperaturas tan elevadas, ya que comúnmente, las temperaturas de trabajo más habituales en este tipo de investigaciones con levaduras no suele superar los 55 °C, dejando las temperaturas más elevadas para estudios de termorresistencia con bacterias (Menegazzi y Ingledew, 1980; Tsang y Ingledew, 1982; Condón *et al.*, 1992a).

En general, los tiempos de reducción decimal a 60 °C (D₆₀) obtenidos en tampón McIlvaine a pH 4 están en concordancia con los encontrados por Put y De Jong (1980) quienes después de estudiar la termorresistencia de 120 cepas de levaduras aisladas de bebidas refrescantes y de productos derivados de fruta, llegaron a la conclusión de que *Saccharomyces cerevisiae* es una de las especies más termorresistentes.

La termorresistencia de las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en tampón McIlvaine pH 7 ha resultado alta si se compara con los resultados publicados por otros autores (Torok y King, 1991b), quienes al estudiar la termorresistencia de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, una de ellas aislada de albaricoques alterados, encontraron tiempos de reducción decimal a 55 °C (D₅₅) de 1,05 min, frente a valores de D₅₈ del orden de 2,1 a 4,4 min, encontrados en esta investigación, para las cepas 26 y 99.

Para una misma cepa, el pH del medio de tratamiento no ha tenido una influencia significativa en su termorresistencia, y se revelan resultados contradictorios frente al pH. Así la cepa 26 ha resultado más termorresistente a pH 4 que a pH 7, mientras que la cepa 99, a excepción del tratamiento a 58 °C, ha mostrado mayor termorresistencia a pH 7. Estos resultados confirman los obtenidos por Splittstoesser *et al.* (1975) quienes como resultado de sus investigaciones concluyen que el pH del medio tiene un efecto muy limitado sobre la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, trabajos llevados a cabo por otros investigadores contradicen a los anteriores al afirmar que cuanto más ácido es el pH del medio de tratamiento más termosensible resulta la cepa estudiada (Deveze y Ribereau-Gayon, 1977).

Al comparar los resultados obtenidos en tampón pH 4 y en cremogenado de melocotón (pH = 3,87), se observa que las tres cepas son más termosensibles al ser tratadas en cremogenado de melocotón. Un efecto similar ha sido observado por otros autores, quienes afirman que, además del pH del medio de tratamiento, la cantidad y el tipo de

azúcares y ácidos orgánicos presentes en el medio pueden ejercer una influencia significativa en la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae* (Beuchat, 1982a; Beuchat, 1983b; Stecchini y Beuchat, 1985).

Donde sí se han apreciado diferencias significativas ha sido entre las diferentes cepas, en especial al ser tratadas en tampón a pH 4 y en cremogenado de melocotón. Así la cepa 26 ha resultado ser la más termorresistente de las tres con unos tiempos de reducción decimal superiores a los de las otras dos cepas en todos los medios y en todas las temperaturas ensayadas. Por el contrario, la cepa 204 ha resultado la más termosensible en todos los medios de tratamiento. Tomando como referencia el valor D_{60} en tampón pH 4 se observa que para la cepa 204 este valor es casi 5 veces menor que para la cepa 99, y casi 8 veces menor que para la cepa 26. Similares diferencias se advierten cuando las cepas han sido tratadas en cremogenado de melocotón.

Los valores de z obtenidos en el presente estudio para las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de cremogenado de melocotón han sido similares a los encontrados por otros autores como Aref y Cruess (1934), que estudiaron la termorresistencia de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de zumo de uva; Splittstoesser *et al.* (1975) que estudiaron la termorresistencia de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en vino, y Barillere *et al.* (1983) que estudió la termorresistencia de *Saccharomyces cerevisiae* en tampón a pH 3,2. Tampoco se han encontrado diferencias significativas al comparar los valores z entre los distintos medios de tratamiento, lo que concuerda con los resultados de Barillere *et al.* (1983) y de Splittstoesser *et al.* (1975).

9 Evolución del color en cremogenado de melocotón

En las muestras de cremogenado de melocotón se han realizado medidas de la reflectancia y se ha estudiado la evolución del color durante los tratamientos térmicos en el espacio CIELAB mediante la evolución de las coordenadas L^* , a^* , b^* , de la diferencia de color (ΔE^*) y de la diferencia de croma (ΔC^*). Además, se ha estudiado la evolución de la absorbancia a 420 nm en la fracción líquida del cremogenado de melocotón.

9.1 Absorbancia a 420 nm (A_{420})

La absorbancia a 420 nm es un indicador de la evolución del color muy utilizado en el estudio del pardeamiento no enzimático en zumos y derivados de frutas. Sin embargo, el cremogenado de melocotón, debido a su opacidad, no permite la medida directa de la absorbancia. Por lo que, las muestras de cremogenado tuvieron que ser clarificadas previamente y, la determinación de la A_{420} se realizó sobre la fracción líquida clarificada del cremogenado.

Los valores experimentales de la absorbancia se han ajustado a los modelos cinéticos de orden cero, de primer orden y combinado descritos en el apartado "Cinéticas de pardeamiento no enzimático" de la Introducción. A partir de las constantes cinéticas obtenidas en los ajustes se ha estudiado el efecto de la temperatura de tratamiento sobre la velocidad de pardeamiento.

En la [Tabla 5-21](#) se muestran resultados del ajuste de la absorbancia a 420 nm al modelo cinético de orden cero y en la [Tabla 5-22](#) los correspondientes a los del modelo de primer orden.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	K10 ³ (min ⁻¹)	r ²
11	80	0,21 ± 0,10	0,17 ± 0,21	0,890
	85	0,10 ± 0,11	0,26 ± 0,04	0,937
	90	0,16 ± 0,14	0,56 ± 0,03	0,938
	95	0,23 ± 0,21	1,2 ± 0,4	0,954
	98	0,3 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,944
20	80	0,201 ± 0,013	0,21 ± 0,05	0,869
	85	0,210 ± 0,011	0,22 ± 0,04	0,899
	90	0,169 ± 0,011	0,66 ± 0,05	0,962
	95	0,123 ± 0,011	1,27 ± 0,05	0,990
	98	0,11 ± 0,03	2,05 ± 0,17	0,962
30	80	0,197 ± 0,008	0,48 ± 0,03	0,974
	85	0,182 ± 0,019	0,91 ± 0,07	0,960
	90	0,12 ± 0,05	2,18 ± 0,22	0,948
	95	0,12 ± 0,06	3,6 ± 0,3	0,965
	98	0,07 ± 0,07	5,2 ± 0,3	0,976
40	80	0,196 ± 0,014	1,08 ± 0,05	0,986
	85	0,16 ± 0,03	2,15 ± 0,14	0,974
	90	0,12 ± 0,04	3,65 ± 0,24	0,974
	95	0,08 ± 0,07	6,7 ± 0,3	0,984
	98	0,14 ± 0,10	7,9 ± 0,5	0,976

Parámetros del ajuste de la variación de la absorbancia relativa al modelo cinético de orden cero para la fracción líquida del cremogenado de melocotón tratado a diferentes temperaturas.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$K_1 10^3$ (min ⁻¹)	r^2
11	80	-1,06 ± 0,15	0,65 ± 0,23	0,890
	85	-1,25 ± 0,13	0,67 ± 0,13	0,937
	90	-1,37 ± 0,11	0,92 ± 0,16	0,938
	95	-1,34 ± 0,13	1,7 ± 0,5	0,954
	98	-1,22 ± 0,15	2,1 ± 0,5	0,944
20	80	-1,60 ± 0,05	0,87 ± 0,21	0,857
	85	-1,55 ± 0,04	0,85 ± 0,17	0,896
	90	-1,73 ± 0,06	2,5 ± 0,3	0,931
	95	-1,88 ± 0,04	4,01 ± 0,19	0,988
	98	-1,76 ± 0,03	4,78 ± 0,16	0,994
30	80	-1,577 ± 0,021	1,58 ± 0,08	0,984
	85	-1,57 ± 0,09	2,41 ± 0,17	0,970
	90	-1,66 ± 0,03	4,62 ± 0,13	0,996
	95	-1,45 ± 0,04	5,46 ± 0,21	0,992
	98	-1,42 ± 0,07	6,4 ± 0,3	0,994
40	80	-1,489 ± 0,013	2,56 ± 0,05	0,998
	85	-1,45 ± 0,03	3,66 ± 0,12	0,994
	90	-1,45 ± 0,05	5,51 ± 0,24	0,988
	95	-1,30 ± 0,14	7,0 ± 0,7	0,947
	98	-1,22 ± 0,21	7,4 ± 1,0	0,899

Parámetros del ajuste de la variación de la absorbancia relativa al modelo cinético de orden uno ($\ln A = \ln A_0 + k_1 t$) para la tracción líquida del cremogenado de melocotón tratado a diferentes temperaturas.

Como puede observarse en las tablas, las constantes cinéticas de ambos modelos, k_0 y k_1 , toman valores muy similares para muestras de igual concentración tratadas a la misma temperatura. Además, los coeficientes de determinación, r^2 , también son semejantes, por lo que resulta difícil decidir cual de los dos modelos describe mejor el proceso. En los dos casos, se observa que tanto un aumento de la concentración como de la temperatura de tratamiento supone un aumento de la constante cinética.

Tabla 5-21

Para el modelo cinético combinado, $A = (k_0/k_1) - [(k_0/k_1) - A_0] \exp(-k_1 t)$, se han obtenido coeficientes de determinación, r^2 , similares a los obtenidos para los modelos de orden cero y uno. Sin embargo, y contrariamente a lo que se esperaba del modelo, no ha resultado posible extraer ninguna relación coherente para ninguna de las dos constantes, k_0 y k_1 , ya que toman valores positivos y negativos sin orden aparente.

Tabla 5-22

Para cuantificar el efecto de la temperatura en la velocidad de pardeamiento, las constantes cinéticas obtenidas en los modelos de orden cero y uno se han ajustado al modelo de Arrhenius. Los resultados obtenidos para este ajuste se recogen en la Tabla 5-23. Los resultados obtenidos de los ajustes al modelo cinético combinado no han sido satisfactorios, por lo que tampoco se ha creído conveniente estudiar el efecto de la temperatura en sus constantes cinéticas.

Orden de reacción	Concentración (°Brix)	K_0 (min^{-1})	E_a (kJ/mol)	r^2
0	11	$(1,0 \pm 0,7)10^{18}$	148 ± 18	0,931
	20	$(1,3 \pm 0,4)10^{18}$	147 ± 23	0,947
	30	$(2,25 \pm 0,23) 10^{18}$	146 ± 43	0,994
	40	$(1,3 \pm 0,4)10^{15}$	109 ± 19	0,994
1	11	$(1,2 \pm 0,8) 10^{15}$	135 ± 43	0,869
	20	$(2,0 \pm 0,8) 10^{14}$	117 ± 38	0,922
	30	$(1,3 \pm 0,9)10^{10}$	85 ± 22	0,962
	40	$(1,8 \pm 0,5) 10^7$	66 ± 16	0,976

Parámetros de la ecuación de Arrhenius resultantes de los ajustes de las constantes cinéticas de los modelos de orden cero y uno para variación de la absorbancia en la tracción líquida de cremogenado de melocotón.

Analizando los coeficientes de determinación, el modelo cinético de orden cero se ajusta mejor a la ecuación de Arrhenius, presentando valores ligeramente más elevados. Estos resultados están en consonancia con los de Saguy *et al.* (1978), Barbanti *et al.* (1990) y Lozano (1991), quienes sugieren que el pardeamiento no enzimático sigue una cinética de orden cero. Por el contrario, Jhonson *et al.* (1995), proponen una cinética de primer orden para la variación de la absorbancia por efecto del pardeamiento no enzimático en zumo y cremogenado de naranja, aunque matizan que este ajuste es mejor a medida que aumenta el contenido en sólidos solubles de las muestras. Por otra parte, González *et al.* (1988b) opinan que para muchos concentrados y zumos de frutas, si la variación de la absorbancia no es muy elevada, resulta difícil discernir entre el orden de reacción del proceso de pardeamiento no enzimático. De modo que para valores de absorbancia relativa (A/A_0) inferiores a 2 la evolución de la absorbancia relativa con el tiempo se ajusta bien a una recta, por lo que se puede suponer que la cinética de pardeamiento no enzimático es de orden cero.

Finalmente, Petriella *et al.* (1985) y Nagy *et al.* (1990) describen el pardeamiento no enzimático como una cinética a medio camino entre la de orden cero y la de primer orden y, no consideran válidos los modelos simplificados de orden cero y orden uno.

Independientemente del orden de reacción, se observa que un aumento del contenido en sólidos solubles supone una disminución del factor de frecuencia, K_0 , y de la energía de activación, E_a , de la ecuación de Arrhenius, siendo, estos valores, inferiores en los ajustes a partir de las constantes de primer orden. Al mismo tiempo, para una misma concentración, la energía de activación presenta valores más elevados en el modelo de orden cero.

Los valores de la energía de activación obtenidos se encuentran entre 148 kJ/mol y 109 kJ/mol para modelo de orden cero, y 135 kJ/mol y 66 kJ/mol para el modelo de primer orden.

Según González *et al.* (1988b) las energías de activación son función de la concentración en sólidos solubles del zumo, de modo que un aumento de la concentración provoca un aumento en la energía de activación, o lo que es lo mismo, un incremento de la sensibilidad del proceso a la temperatura. Los resultados obtenidos para el cremogenado de melocotón parecen estar en desacuerdo con la teoría anterior, ya que a mayor concentración se han obtenido menores energías de activación. No obstante, es importante resaltar que, para la cinética de orden cero, las energías de activación que se han obtenido en las muestras de cremogenado de melocotón de 11, 20 y 30 °Brix, son muy similares, alrededor de 147 kJ/mol, sin embargo, cuando la concentración aumenta a 40 °Brix, se observa un gran descenso en la energía de activación, bajando a 109 kJ/mol, lo que indica que estas muestras son menos sensibles a los incrementos de temperatura.

9.2 Espectros de reflectancia

Los espectros de reflectancia tienen escaso valor práctico cuando se pretende utilizarlos para el control rutinario del color de los alimentos, sin embargo, la utilidad de estos espectros se encuentra en el hecho de que sirven como medio para una posterior determinación de los parámetros colorimétricos (Durán, 1978).

Dada la coloración del cremogenado, eran de esperar los resultados obtenidos. Al analizar los espectros de reflectancia, se observa en todos los casos que, sin importar la concentración de la muestra o la temperatura de tratamiento, la reflectancia se mantiene casi constante, o con un ligerísimo aumento, hasta los 500 nm de longitud de onda. Siendo a partir de esta longitud de onda cuando la reflectancia de la muestra comienza a aumentar de forma progresiva coincidiendo con los intervalos de longitudes de onda correspondientes a la zona de los amarillos (570-590 nm), naranjas (590-610 nm) y alcanzando los valores máximos en la zona de los rojos (610-700 nm).

En las figuras adjuntas ([Figura 5-49](#) y [Figura 5-50](#)) puede observarse cómo los valores de reflectancia de las muestras disminuye paulatinamente a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Es decir que a medida que el tratamiento térmico se hace más largo la fracción de luz reflejada disminuye y la absorbida aumenta. Esta tendencia ha sido, también, general en todas las muestras de cremogenado de melocotón analizadas.

El efecto de la concentración en los espectros de reflectancia ha sido claro, de forma que cuanto mayor ha sido la concentración en sólidos solubles de las muestras, menores han sido los valores que ha presentado la reflectancia, y por tanto, las variaciones a lo largo del espectro han sido también menores. La concentración también ha tenido el efecto de reducir las variaciones de reflectancia entre las muestras tratadas durante menos tiempo y las que más.

Para tratar de ilustrar el efecto de la concentración sobre los espectros de reflectancia se han elegido los espectros correspondientes a las muestras de 20, 30 y 40 °Brix, tratadas a 98 °C ([Figura 5-49](#)).

La temperatura de tratamiento ha tenido un efecto muy evidente sobre la reflectancia, de forma que al aumentar la temperatura de tratamiento, se han visto acusadas las diferencias entre las muestras provocadas por la duración del tratamiento térmico. En la [Figura 5-50](#) se muestra, a modo de ejemplo los espectros de las muestras de cremogenado de melocotón de 30 °Brix tratadas a 80, 90 y 98 °C, donde pueden apreciarse de forma gráfica el efecto de la temperatura sobre la reflectancia.

9.3 Trayectoria del color en el espacio CIELAB

Para caracterizar la evolución del color durante el tratamiento térmico se ha elegido el espacio colorimétrico CIELAB, siendo L^* , a^* y b^* los tres ejes de coordenadas. Las variaciones del eje L^* significan cambios en la luminosidad y las variaciones en el plano determinado por a^* y b^* suponen cambios en el tono.

En la [Figura 5-51](#) se representa, a modo de ejemplo, la variación de la luminosidad de una muestra de cremogenado de melocotón de 30 °Brix tratada a diferentes temperaturas. En general, la luminosidad ha disminuido al aumentar el tiempo y la temperatura de tratamiento. Además, los valores de L^* han sido menores al aumentar el contenido en sólidos solubles. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Sapers y Douglas, 1987), que afirman que un aumento de la temperatura favorece el proceso de pardeamiento no enzimático, encontrando además una correlación entre la disminución de L^* y el incremento del pardeamiento.

Los valores obtenidos para el parámetro a^* no han presentado una tendencia clara durante el tratamiento, especialmente cuando se ha trabajado a temperaturas y concentraciones bajas, sin embargo a concentraciones elevadas, se ha observado que los valores de a^* tienden a alcanzar un máximo para después disminuir a medida que aumenta el tiempo de tratamiento ([Figura 5-52](#)).

La evolución de b^* ha sido mucho más clara y, tal y como sucedía con la luminosidad, tiende a disminuir al incrementarse la temperatura y el tiempo de tratamiento, así como al aumentar la concentración de las muestras.

En la [Figura 5-53](#) se representa la trayectoria que sigue el color del cremogenado de melocotón de distintas concentraciones tratado a 98 °C en el plano determinado por los ejes verde/rojo ($-a^*/+a^*$) y azul-amarillo ($-b^*/+b^*$). En todos los casos estudiados todos los puntos se ha situado en el cuadrante delimitado por los tonos rojo y amarillo. Se observa cómo, a medida que la concentración es más elevada, y conforme aumenta el tiempo de tratamiento, se produce un desplazamiento en el color hacia el origen de coordenadas, lo que implica una disminución de la pureza del color.

9.4 Luminosidad

Con la finalidad de encontrar una expresión matemática que describa la cinética de la variación de la luminosidad en el cremogenado de melocotón durante el tratamiento térmico, se ha trabajado con la luminosidad relativa (L^*/L^*_0). La luminosidad relativa se ha ajustado a los modelos cinéticos de orden cero y uno.

En la Tabla 5-24 se representan los parámetros obtenidos para el ajuste de la luminosidad relativa al modelo cinético de orden cero, y en la Tabla 5-25 los correspondientes al modelo de orden uno.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$K_0 10^4$ (min^{-1})	r^2
11	80	$0,948 \pm 0,014$	$0,92 \pm 0,21$	0,903
	85	$0,921 \pm 0,025$	$1,75 \pm 0,12$	0,940
	90	$0,99 \pm 0,03$	$2,9 \pm 0,5$	0,982
	95	$0,907 \pm 0,018$	$4,5 \pm 0,3$	0,987
	98	$0,94 \pm 0,04$	$6,5 \pm 0,4$	0,996
20	80	$0,987 \pm 0,004$	$1,79 \pm 0,16$	0,952
	85	$0,987 \pm 0,005$	$2,87 \pm 0,21$	0,970
	90	$0,994 \pm 0,003$	$4,82 \pm 0,15$	0,994
	95	$0,980 \pm 0,008$	$6,8 \pm 0,4$	0,978
	98	$0,984 \pm 0,008$	$8,5 \pm 0,4$	0,986
30	80	$0,993 \pm 0,003$	$2,73 \pm 0,12$	0,988
	85	$0,989 \pm 0,004$	$4,30 \pm 0,17$	0,990
	90	$0,987 \pm 0,006$	$7,4 \pm 0,3$	0,990
	95	$0,972 \pm 0,017$	$9,5 \pm 0,8$	0,954
	98	$0,960 \pm 0,022$	$10,6 \pm 1,1$	0,939
40	80	$0,982 \pm 0,004$	$3,80 \pm 0,18$	0,986
	85	$0,974 \pm 0,008$	$5,5 \pm 0,3$	0,976
	90	$0,969 \pm 0,014$	$7,7 \pm 0,7$	0,950
	95	$0,953 \pm 0,020$	$9,2 \pm 1,0$	0,933
	98	$0,94 \pm 0,03$	$9,6 \pm 1,4$	0,910

Parámetros del ajuste de la luminosidad relativa al modelo cinético de orden cero, para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$K_1 10^4$ (min^{-1})	r^2
11	80	$-0,009 \pm 0,008$	0,98 0,08	0,935
	85	$-0,020 \pm 0,007$	1,14, 0,19	0,948
	90	$-0,009 \pm 0,004$	2,34 0,17	0,949
	95	$-0,021 \pm 0,012$	4,89 0,25	0,982
	98	$-0,019 \pm 0,013$	7,1 \pm 0,4	0,990
20	80	$-0,011 \pm 0,004$	1,88 \pm 0,16	0,956
	85	$-0,012 \pm 0,005$	3,11 \pm 0,20	0,974
	90	$-0,003 \pm 0,003$	5,30 \pm 0,17	0,994
	95	$-0,016 \pm 0,007$	7,9 \pm 0,3	0,988
	98	$-0,010 \pm 0,007$	10,1 \pm 0,3	0,992
30	80	$-0,006 \pm 0,003$	2,93 \pm 0,12	0,990
	85	$-0,008 \pm 0,004$	4,83 \pm 0,15	0,994
	90	$-0,009 \pm 0,006$	8,62 \pm 0,24	0,994
	95	$-0,022 \pm 0,016$	11,7 \pm 0,8	0,976
	98	$-0,023 \pm 0,022$	13,4 \pm 1,1	0,960
40	80	$-0,016 \pm 0,004$	4,24 \pm 0,17	0,990
	85	$-0,022 \pm 0,007$	6,4 \pm 0,3	0,988
	90	$-0,028 \pm 0,014$	9,1 \pm 0,7	0,964
	95	$-0,044 \pm 0,020$	11,5 \pm 1,0	0,954
	98	$-0,06 \pm 0,03$	12,2 \pm 1,4	0,920

Parámetros del ajuste de la luminosidad relativa al modelo cinético de primer orden, para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

Los valores que toma la ordenada en el origen en los dos modelos ensayados son próximos a los valores teóricos esperados, ya que, al trabajar con valores relativos, la ordenada en el origen para el modelo de orden cero debería ser uno, y para el modelo de orden uno linealizado debería ser cero.

Respecto a las constantes cinéticas, en los cremogenados de 11, 20 y 30 °Brix, su valor aumenta a medida la temperatura y la concentración son más elevadas. Esto confirma los resultados de otros estudios en los cuales un aumento de temperatura de tratamiento y una mayor concentración del producto tratado tiende a favorecer el proceso de pardeamiento no enzimático (Ibarz, *et al.* 1989b). En las muestras de cremogenado de 40 °Brix, si bien las constantes cinéticas aumentan al aumentar la temperatura, contrariamente a lo esperado, los valores de dichas constantes para las temperaturas más elevadas de tratamiento, 95 y 98 °C, han resultado ser inferiores a los alcanzados en las muestras de 30 °Brix, para las mismas temperaturas de tratamiento. Este comportamiento puede ser debido a que a concentraciones elevadas, a partir de un cierto tiempo de tratamiento el valor de la luminosidad tiende a estabilizarse, y por tanto disminuye su velocidad de variación.

Aunque resulta difícil determinar cual de los dos modelos describe mejor la evolución de la luminosidad relativa del cremogenado de melocotón durante el pardeamiento no enzimático, ya que para ambos modelos se han obtenido valores de los coeficientes de determinación, r^2 , bastante elevados ($r^2 = 0,903$ para el caso más desfavorable), los obtenidos para el modelo de orden uno han sido ligeramente superiores en todos los casos.

Las constantes cinéticas correspondientes a los dos modelos probados se han ajustado a la ecuación de Arrhenius con el objeto de determinar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de pardeamiento.

Los valores de los parámetros de la ecuación de Arrhenius obtenidos a partir de los ajustes se muestran en la Tabla 5-26. Los coeficientes de determinación expresan un mejor ajuste a la ecuación de Arrhenius en el caso de las constantes cinéticas obtenidas a partir del modelo de primer orden que, como ya se ha dicho antes, es el que ha dado un mejor ajuste.

Orden de reacción	Concentración (°Brix)	K_0 (min^{-1})	E_a (kJ/mol)	r^2
0	11	$(7,2 \pm 0,7) 10^{10}$	90 ± 31	0,952
	20	$(4,34 \pm 0,22) 10^9$	77 ± 12	0,970
	30	$(5,25 \pm 0,16) 10^{10}$	85 ± 35	0,978
	40	$(5,1 \pm 0,6) 10^6$	58 ± 16	0,966
1	11	$(8,5 \pm 0,9) 10^{11}$	110 ± 19	0,923
	20	$(3,14 \pm 0,18) 10^{11}$	102 ± 13	0,998
	30	$(3,48 \pm 0,19) 10^{10}$	95 ± 21	0,982
	40	$(2,18 \pm 0,23) 10^6$	65 ± 25	0,976

Parámetros de la ecuación de Arrhenius resultantes de los ajustes de las constantes cinéticas de los modelos de orden cero y uno para variación de la luminosidad en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones.

Los valores de la energía de activación obtenidos para el modelo de orden uno han sido superiores a los obtenidos para el modelo de orden cero. En la cinética de primer orden se observa que el valor de la energía de activación disminuye al aumentar la concentración de las muestras, lo que indica que el efecto de la temperatura en la velocidad de variación de la luminosidad es menor a concentraciones más altas. Esto coincide con los resultados obtenidos en algunos estudios del mismo tipo, realizados en concentrados clarificados de pera por Ibarz *et al.* (1989b). Sin embargo en la cinética de orden cero el comportamiento de la energía de activación con la concentración no ha sido tan claro. Así, en cremogenado a 30 °Brix se ha obtenido un valor de la E_a superior al obtenido en las muestras de 40 °Brix. Los resultados obtenidos por otros autores (Beveridge y Harrison, 1984; Toribio y Lozano, 1984; 1986) en los que tampoco se ha comprobado una tendencia clara en este aspecto, coinciden con lo observado en este caso.

9.5 Diferencia de color

Los valores experimentales obtenidos para la diferencia de color se han ajustado al modelo cinético de orden cero y al modelo cinético combinado. La Tabla 5-27 recoge los parámetros resultantes del ajuste al modelo cinético de orden cero, y la Tabla 5-28 los correspondientes al modelo cinético combinado, descritos en el apartado 18.1. "Modelos cinéticos para la evolución del color" de la Introducción.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$K_0 10^2$ (min ⁻¹)	r^2
11	80	0,7 ± 0,8	0,52 ± 0,17	0,926
	85	0,3 ± 0,3	0,66 ± 0,12	0,960
	90	0,3 ± 0,3	0,98 ± 0,12	0,962
	95	0,8 ± 0,7	1,09 ± 0,24	0,960
	98	1,2 ± 0,6	1,24 ± 0,24	0,972
20	80	0,7 ± 0,3	1,15 ± 0,10	0,994
	85	0,6 ± 0,3	1,93 ± 0,12	0,976
	90	0,17 ± 0,19	3,58 ± 0,10	0,996
	95	0,9 ± 0,4	4,87 ± 0,22	0,988
	98	0,7 ± 0,6	6,1 ± 0,3	0,986
30	80	0,24 ± 0,20	1,65 ± 0,08	0,986
	85	0,4 ± 0,3	2,68 ± 0,09	0,992
	90	0,4 ± 0,3	4,62 ± 0,15	0,994
	95	1,4 ± 1,0	6,0 ± 0,5	0,956
	98	2,2 ± 1,4	6,8 ± 0,7	0,942
40	80	0,6 ± 0,2	1,93 ± 0,08	0,990
	85	1,0 ± 0,4	2,85 ± 0,14	0,986
	90	1,3 ± 0,6	4,0 ± 0,3	0,964
	95	2,1 ± 1,1	5,0 ± 0,5	0,946
	98	2,9 ± 1,6	5,3 ± 0,7	0,910

Parámetros del ajuste de la variación de la diferencia de color al modelo cinético de orden cero, para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

Concentración (°Brix)	T (°C)	$k_0 10^2$ (min^{-1})	$k_1 10^3$ (min^{-1})	r^2
11	80	1,8 ± 1,8	1,7 ± 1,0	0,824
	85	1,1 ± 0,4	1,15 ± 0,20	0,962
	90	1,1 ± 0,4	1,22 ± 0,18	0,960
	95	2,7 ± 0,6	1,76 ± 0,18	0,980
	98	4,0 ± 1,0	2,42 ± 0,24	0,974
20	80	2,2 ± 0,6	2,74 ± 1,16	0,954
	85	2,72 ± 1,23	1,4 ± 0,8	0,976
	90	4,6 ± 1,7	1,7 ± 0,8	0,986
	95	7,0 ± 0,6	2,2 ± 0,3	0,998
	98	8,2 ± 1,6	1,9 ± 0,5	0,994
30	80	1,89 ± 0,22	0,5 ± 0,6	0,984
	85	3,3 ± 1,4	0,8 ± 0,4	0,992
	90	5,7 ± 1,3	1,2 ± 0,3	0,996
	95	10,3 ± 1,6	3,4 ± 0,9	0,986
	98	13,4 ± 1,1	4,4 ± 0,6	0,992
40	80	2,9 ± 0,8	1,6 ± 0,6	0,984
	85	4,7 ± 0,4	2,2 ± 0,3	0,996
	90	7,4 ± 0,6	3,9 ± 0,5	0,996
	95	10,8 ± 0,5	4,9 ± 0,4	0,996
	98	13,9 ± 0,5	6,4 ± 0,6	0,997

Parámetros del ajuste de la variación de la diferencia de color al modelo cinético combinado, para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

Los coeficientes de determinación, r^2 , obtenidos para los ajustes al modelo cinético de primer orden han sido bastante elevados (superiores en todos los casos a 0,910), lo que en principio indica un buen ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto, sin embargo, la evolución de los datos experimentales ([Figura 5-54](#) y [Figura 5-55](#)) solamente siguen una tendencia lineal en las primeras fases del tratamiento térmico, y a partir de un determinado tiempo de tratamiento la evolución de la diferencia de color, a pesar de que los valores siempre aumentan con el tiempo, se ralentiza, es decir, la velocidad a la que aumenta la diferencia de color va disminuyendo a medida que el tratamiento térmico se prolonga. Esto resulta más evidente cuanto más elevada es la temperatura de tratamiento y más concentrada es la muestra tratada. Este comportamiento provoca que los valores de la ordenada en el origen, obtenidos para el modelo cinético de orden cero, que teóricamente deberían ser cero, sean más elevados de los que cabría esperar, especialmente en las muestras de cremogenado de melocotón de concentraciones más elevadas sometidas a las temperaturas más elevadas, así por ejemplo, en cremogenado de melocotón de 40 °Brix tratado a 98°C la ordenada en el origen es de 2,9. Además, y debido al mismo motivo explicado antes, se ha observado que las constantes cinéticas obtenidas en muestras de 40 °Brix tratadas a temperaturas altas, de 90, 95 y 98 °C, toman valores inferiores que cuando la concentración del cremogenado es de sólo 30 °Brix. Finalmente, examinando los valores de los coeficientes de determinación de la [Tabla 5-28](#) se advierte que, a las concentraciones de 30 y 40 °Brix, se hacen más bajos a medida que aumenta la temperatura de tratamiento. De todo lo dicho puede deducirse que el modelo

cinético de orden cero explica de forma aceptable la variación de la diferencia de color en cremogenado de melocotón de concentraciones bajas, pero que a medida que la concentración de las muestras y la temperatura de tratamiento aumenta el modelo se aleja cada vez más de los datos experimentales. Con la finalidad de solventar este inconveniente algunos autores (González *et al.*, 1988b) proponen el modelo cinético combinado donde se supone una cinética de formación de color de orden cero y una destrucción de pigmentos de primer orden.

Los coeficientes de determinación obtenidos, parecen indicar que el modelo cinético combinado describe mejor las variaciones del color que tienen lugar en el cremogenado de melocotón durante su tratamiento térmico. Las dos etapas que contempla el modelo transcurren a más velocidad cuando la concentración y la temperatura se incrementan. Por otro lado, para una concentración dada, las constantes cinéticas siguen una clara tendencia a aumentar a medida que la temperatura de tratamiento se hace más alta. También se advierte que los valores de la constante k_1 , correspondiente a la segunda etapa de destrucción de polímeros coloreados, toma valores inferiores respecto de la constante de la primera etapa (k_0), de formación de compuestos coloreados.

La [Figura 5-56](#) representa la variación de la diferencia de color y los ajustes al modelo cinético combinado en cremogenado de melocotón de 40 °Brix.

Lozano *et al.* (1994), en estudios del mismo tipo realizados en cremogenado de melocotón, donde aplican el mismo modelo cinético, obtienen valores de las constantes cinéticas muy similares.

Las constantes cinéticas de los modelos anteriores han sido ajustadas a la ecuación de Arrhenius para determinar el efecto de la temperatura sobre la diferencia de color. Los coeficientes de determinación, r^2 , obtenidos (Tabla 5-29) indican un buen grado de ajuste al modelo de Arrhenius, exceptuando el obtenido para la segunda etapa del modelo combinado en cremogenado de melocotón de 20 °Brix, donde parece ser que la destrucción de pigmentos que contempla este modelo no guarda relación clara con la temperatura de tratamiento.

Orden de reacción	Concentración (°Brix)	K_0 (min^{-1})	E_a (kJ/mol)	r^2
0	11	$(6,9 \pm 0,6) 10^4$	112 ± 32	0,984
	20	$(1,7 \pm 0,6) 10^{13}$	102 ± 21	0,988
	30	$(1,8 \pm 0,24) 10^{11}$	91 ± 29	0,976
	40	$(3,5 \pm 0,5) 10^7$	62 ± 36	0,974
1ª etapa del modelo combinado	11	$(2,4 \pm 0,8) 10^4$	82 ± 19	0,974
	20	$(1,1 \pm 0,3) 10^{11}$	85 ± 21	0,984
	30	$(1,4 \pm 0,8) 10^{16}$	91 ± 30	0,999
	40	$(3,1 \pm 0,5) 10^{12}$	94 ± 18	0,998
2ª etapa del modelo combinado	11	$(5,6 \pm 0,7) 10^{-3}$	23 ± 19	0,823
	20	$(1,25 \pm 0,21) 10^{-4}$	$8,22 \pm 3$	0,858
	30	$(1,0 \pm 0,19) 10^{17}$	137 ± 32	0,970
	40	$(5,09 \pm 0,23) 10^9$	84 ± 15	0,988

Parámetros de la ecuación de Arrhenius resultantes de los ajustes de las constantes cinéticas de los modelos de orden cero y combinado para la variación de la diferencia de color en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones.

Para la cinética de orden cero se produce una disminución de la energía de activación

a aumentar el contenido en sólidos solubles de las muestras. Por el contrario para la primera etapa del modelo combinado se da el caso contrario, aunque los valores que toma la energía de activación son muy similares en las cuatro concentraciones estudiadas, y en la segunda etapa del modelo combinado no se ha apreciado ninguna tendencia clara.

9.6 Diferencia de croma

Al igual que con la diferencia de color, para estudiar la cinética de variación de la diferencia de croma (ΔC^*), se han realizado ajustes de los valores experimentales a los modelos cinéticos de orden cero y combinado descritos en el apartado 18.1 Modelos cinéticos para la evolución del color" de la Introducción.

En general, la evolución de la diferencia de croma ha seguido una trayectoria similar a la que se ha descrito para la diferencia de color. En los primeros momentos del tratamiento se produce un aumento en la diferencia de croma que, con el paso del tiempo, tiende estabilizarse en un valor máximo. Esta estabilización parece ser más rápida cuando la concentración de las muestras y la temperatura de tratamiento es más alta.

En el ajuste al modelo cinético de orden cero, para una concentración determinada, las diferencias de croma han sido cada vez mayores a medida que aumenta la temperatura de tratamiento (Tabla 5-30). También las constantes cinéticas han aumentado al hacerlo la temperatura de tratamiento.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$k_0 10^3$ (min^{-1})	r^2
11	80	$0,63 \pm 0,21$	$4,25 \pm 0,12$	0,921
	85	$0,8 \pm 0,3$	$7,36 \pm 0,15$	0,916
	90	$0,54 \pm 0,19$	$15,81 \pm 0,22$	0,972
	95	$0,6 \pm 0,4$	$20,9 \pm 0,4$	0,980
	98	$1,3 \pm 0,7$	$28,4 \pm 0,5$	0,985
20	80	$0,32 \pm 0,19$	$8,5 \pm 0,9$	0,947
	85	$0,2 \pm 0,3$	$14,2 \pm 1,2$	0,964
	90	$-0,05 \pm 0,15$	$28,1 \pm 0,7$	0,996
	95	$0,3 \pm 0,3$	$36,7 \pm 1,2$	0,992
	98	$0,2 \pm 0,5$	$46,6 \pm 2,2$	0,986
30	80	$0,07 \pm 0,21$	$12,2 \pm 1,0$	0,966
	85	$0,10 \pm 0,21$	$21,0 \pm 1,0$	0,988
	90	$0,06 \pm 0,21$	$35,6 \pm 1,1$	0,994
	95	$0,8 \pm 0,8$	46 ± 4	0,956
	98	$1,5 \pm 1,1$	52 ± 5	0,942
40	80	$0,48 \pm 0,16$	$14,6 \pm 0,8$	0,986
	85	$0,52 \pm 0,19$	$23,6 \pm 0,9$	0,992
	90	$0,9 \pm 0,4$	$31,0 \pm 2,2$	0,970
	95	$1,4 \pm 0,7$	40 ± 3	0,952
	98	$1,9 \pm 1,0$	42 ± 5	0,920

Parámetros del ajuste de la variación de la diferencia de croma (ΔC^*), al modelo cinético de orden cero para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

Al igual que ocurría con la diferencia de color, para una temperatura fija, los valores de las constantes cinéticas han sido máximos para el cremogenado de 30 °Brix. De acuerdo con los valores obtenidos para los coeficientes de determinación, podría decirse que la cinética de orden cero describe de manera satisfactoria la evolución de la diferencia de croma. No obstante, y del mismo modo que ocurría con la diferencia de color, a concentraciones y temperaturas elevadas se ha observado una relación no lineal de la variación del parámetro con el tiempo de tratamiento.

Tabla 5-30

En el modelo combinado, tal y como se preveía, las constantes cinéticas de orden cero son siempre superiores a las de primer orden (Tabla 5-31). El modelo presenta un buen ajuste en todos los casos pero, en algunas ocasiones, a temperaturas y concentraciones bajas, la constante cinética de destrucción de pigmentos adquiere signo negativo, lo que dificulta la interpretación de los resultados y la obtención de conclusiones definitivas.

Concentración (°Brix)	T (°C)	$K_0 10^2$ (min^{-1})	$K_1 10^3$ (min^{-1})	r^2
11	80	$1,1 \pm 0,8$	$1,5 \pm 1,2$	0,895
	85	$1,2 \pm 0,6$	$-0,15 \pm 0,19$	0,954
	90	$2,1 \pm 0,3$	$-0,22 \pm 0,24$	0,975
	95	$3,7 \pm 0,5$	$1,11 \pm 0,18$	0,988
	98	$4,9 \pm 1,2$	$1,60 \pm 0,24$	0,995
20	80	$1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 1,8$	0,925
	85	$1,5 \pm 0,3$	$-0,2 \pm 1,3$	0,962
	90	$2,70 \pm 0,17$	$-0,2 \pm 0,4$	0,996
	95	$4,53 \pm 0,22$	$1,3 \pm 0,4$	0,996
	98	$5,7 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,6$	0,992
30	80	$1,2 \pm 0,3$	$-0,1 \pm 1,3$	0,964
	85	$2,2 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,7$	0,988
	90	$3,93 \pm 0,23$	$0,7 \pm 0,4$	0,996
	95	$7,5 \pm 0,9$	$3,1 \pm 1,0$	0,982
	98	$9,8 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,8$	0,990
40	80	$2,3 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,9$	0,982
	85	$3,34 \pm 0,21$	$1,8 \pm 0,4$	0,996
	90	$5,3 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,5$	0,996
	95	$7,8 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,5$	0,996
	98	$10,1 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,6$	0,994

Parámetros del ajuste de la variación de la diferencia de croma (ΔC^*), al modelo cinético combinado, para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

El efecto de la temperatura se ha determinado mediante el ajuste de las constantes cinéticas a la ecuación de Arrhenius (Tabla 5-32).

Orden de reacción	Concentración (°Brix)	K_0 (min^{-1})	E_a (kJ/mol)	r^2
0	11	$(3,2 \pm 0,6) 10^{12}$	105 ± 33	0,948
	20	$(2,1 \pm 0,5) 10^{13}$	103 ± 47	0,980
	30	$(1,9 \pm 0,4) 10^{11}$	88 ± 32	0,972
	40	$(4,5 \pm 0,5) 10^7$	63 ± 28	0,966
0 1ª etapa del modelo combinado	11	-	-	-
	20	-	-	-
	30	$(1,1 \pm 0,3) 10^{17}$	127 ± 49	0,998
	40	$(7,3 \pm 0,4) 10^{11}$	91 ± 24	0,999
1 2ª etapa del modelo combinado	11	-	-	-
	20	-	-	-
	30	$(3,5 \pm 0,6) 10^{36}$	268 ± 69	0,984
	40	$(9,6 \pm 0,4) 10^6$	65 ± 26	0,848

Parámetros de la ecuación de Arrhenius resultantes de los ajustes de las constantes cinéticas de los modelos de orden cero y combinado para variación de la diferencia de cromas en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones.

Los coeficientes de determinación indican un buen ajuste al modelo. Para la cinética combinada se ha estudiado el efecto de la temperatura en cada una de las dos constantes cinéticas, sin tener en cuenta aquellos casos en los que k_1 tomaba valores negativos.

En general, las energías de activación obtenidas han sido menores al aumentar la concentración de las muestras de cremogenado. A 30 °Brix el valor de la energía de activación de la primera etapa del modelo ha sido inferior a la de la segunda, de lo que se deduce que existe una mayor influencia de la temperatura en la etapa de destrucción de polímeros coloreados que en la de formación de los mismos. Sin embargo, en cremogenado de melocotón de 40 °Brix se ha dado el caso contrario.

9.7 Índice de pardeamiento de buera

Además de todos los índices colorimétricos mencionados anteriormente, también se ha ensayado, como parámetro para describir el pardeamiento no enzimático, el índice de pardeamiento (BR) propuesto por Buera *et al.* (1985) y descrito en apartados anteriores.

Como en el caso de los índices anteriores, a partir de los valores experimentales se han calculado los valores relativos (BR/BR_0), y éstos se han ajustado a cinéticas de orden cero y uno con el fin de determinar cual de los dos modelos describe más acertadamente la evolución de este índice a lo largo del tratamiento térmico.

En el caso del cremogenado de melocotón el índice de pardeamiento de Buera no se ha revelado como un parámetro idóneo para describir el pardeamiento no enzimático. Este índice no ha mostrado ninguna tendencia definida en las muestras de cremogenado de melocotón de concentraciones bajas (11 y 20 °Brix), por lo que no ha sido posible ajustar los datos experimentales a ninguno de los modelos cinéticos señalados. La [Figura 5-57](#) ilustra de forma gráfica este aspecto para el caso concreto de cremogenado de melocotón de 20 °Brix.

Únicamente para concentraciones altas (30 y 40 °Brix) ha sido posible ajustar de forma aceptable la evolución del índice de pardeamiento con el tiempo de tratamiento al modelo lineal. En la [Figura 5-58](#) se representa la evolución del índice de pardeamiento

relativo en cremogenado de melocotón de 40 °Brix, así como las rectas del ajuste al modelo cinético de orden cero.

En la Tabla 5-33 se muestran los parámetros del ajuste al modelo de orden cero para cremogenado de melocotón de 30 y 40 °Brix. Para la concentración de 30 °Brix solamente se consiguen buenos coeficientes de determinación para los tratamientos realizados a altas temperaturas. Sin embargo cuando la concentración es de 40 °Brix los coeficientes de determinación son altos en todos los casos. La constante de velocidad aumenta de forma progresiva al aumentar la temperatura de tratamiento.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada en el origen	$k10^4$ (min ⁻¹)	r^2
30	80	0,9 ± 0,8	0,94 ± 0,12	0,279
	85	1,00 ± 0,04	1,84 ± 0,16	0,709
	90	1,02 ± 0,06	4,6 ± 0,3	0,878
	95	0,98 ± 0,16	8,7 ± 0,8	0,932
	98	1,002 ± 0,022	12,5 ± 1,1	0,995
40	80	0,99 ± 0,04	3,25 ± 0,17	0,927
	85	1,00 ± 0,07	7,4 ± 0,3	0,976
	90	1,01 ± 0,14	11,0 ± 0,7	0,984
	95	1,025 ± 0,020	18,5 ± 1,0	0,992
	98	1,01 ± 0,03	22,2 ± 1,5	0,984

Valores de los parámetros del ajuste de la variación del índice de pardeamiento relativo (BR/BR₀) al modelo cinético de orden cero, para cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a distintas temperaturas.

De acuerdo con los resultados obtenidos parece oportuno señalar que, en cremogenado de melocotón, el índice de pardeamiento de Buera solamente resulta aplicable como índice evaluador del pardeamiento enzimático cuando se trabaja con muestras de elevada concentración (40 °Brix o superiores) y en tratamiento con altas temperaturas. Debido a la poca fiabilidad de los resultados obtenidos sería necesario realizar investigaciones más extensas en este campo antes de poder decidir sobre la aplicación de este índice como parámetro estimador del pardeamiento no enzimático en cremogenado de melocotón.

Por otra parte, las pocas referencias bibliográficas donde se menciona este índice como parámetro de caracterización del pardeamiento no enzimático en derivados de fruta hace difícil establecer comparaciones y determinar lo adecuado o no de su uso para este tipo de productos.

10 Formación de hidroximetilfurfural durante el tratamiento térmico

Durante el proceso de tratamiento térmico del cremogenado de melocotón se ha observado que el contenido de HMF aumenta con el tiempo de tratamiento. En la [Figura 5-59](#) se muestran los valores experimentales obtenidos para la variación de la concentración de HMF en cremogenados de melocotón de 10 y 20 °Brix tratados a diferentes temperaturas, y en la [Figura 5-60](#) los correspondientes a cremogenados de melocotón de 30 y 40 °Brix.

En este caso la concentración de hexosas ha sido muy grande en comparación con la de hidroximetilfurfural. Los resultados de la caracterización del cremogenado inicial revelan unos valores para las concentraciones de glucosa y fructosa de 9,1 y 10,9 g/kg

respectivamente, mientras que la concentración de HMF en el cremogenado inicial tan solo alcanza las 85 ppm, es decir 0,085 g/kg. Según esto la concentración total de hexosas ($C_H = C_G + C_{FR}$) puede suponerse que es aproximadamente igual a la concentración global ($C_0 = C_H + C_{HMF}$):

$$C_0 \cong C_H = 0,111 \text{ moles de hexosa/ kg de cremogenado}$$

mientras que la de HMF es de 0,000674 moles de HMF/kg de cremogenado. Así pues, la concentración de HMF puede considerarse despreciable frente a la de hexosas, lo que permite suponer que la cinética de formación de HMF puede ser descrita mediante un modelo de primer orden, tal y como se describe en el apartado 18.2.- "Modelos cinéticos para la formación de 5-hidroximetilfurfural" de la Introducción.

En las figuras anteriores puede apreciarse también cómo el contenido de HMF aumenta mucho más rápidamente en aquellas muestras con un contenido en sólidos solubles más elevado y que han sido tratados a temperaturas más altas.

En la [Figura 5-61](#) puede observarse, de forma clara, la influencia que tiene el contenido en sólidos solubles de las muestras tratadas sobre la formación de HMF. Así, tomando como ejemplo los tratamientos realizados a 98 °C, y comparando la evolución que ha seguido la formación de HMF durante el tratamiento térmico en los cremogenados de melocotón con los diferentes contenidos en sólidos solubles ensayados, se advierte una relación evidente entre el contenido en sólidos solubles de las muestras y la concentración de HMF. Para las cuatro concentraciones ensayadas se aprecia un aumento del contenido de HMF con el tiempo de tratamiento, y este incremento en la concentración de HMF es mucho mayor cuanto mayor es la concentración en sólidos solubles de las muestras de cremogenado. De esta forma, la concentración de HMF que se ha alcanzado en el cremogenado de 11 °Brix, tras 360 minutos de tratamiento a 98 °C, no ha superado las 200 ppm, en cremogenado de 20 °Brix la concentración de HMF ha aumentado hasta alcanzar las 426 ppm, en cremogenado de 30 °Brix la concentración de HMF ha llegado hasta las 770 ppm, y finalmente en cremogenado de 40 °Brix la concentración final se ha situado en valores próximos a las 1000 ppm.

Los valores experimentales de concentraciones absolutas de HMF se han transformado en valores de concentraciones relativas de HMF [HMF/HMF_0] y se han ajustado a un modelo cinético de primer orden. En la Tabla 5-34 se presentan los resultados obtenidos para los citados ajustes.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$K_1 10^3$ (min^{-1})	r^2
11	80	$1,06 \pm 0,23$	$0,34 \pm 0,15$	0,537
	85	$1,10 \pm 0,13$	$0,72 \pm 0,16$	0,857
	90	$1,02 \pm 0,21$	$0,61 \pm 0,20$	0,724
	95	$1,1 \pm 0,3$	$1,9 \pm 1,2$	0,960
	98	$1,1 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,9$	0,930
20	80	$1,02 \pm 0,18$	$1,0 \pm 0,3$	0,938
	85	$1,07 \pm 0,15$	$1,6 \pm 0,4$	0,934
	90	$1,01 \pm 0,21$	$3,0 \pm 0,8$	0,989
	95	$1,0 \pm 0,4$	$3,6 \pm 1,2$	0,984
	98	$0,9 \pm 0,7$	$4,8 \pm 2,1$	0,998
30	80	$0,99 \pm 0,12$	$1,7 \pm 0,4$	0,952
	85	$0,95 \pm 0,18$	$2,7 \pm 0,4$	0,982
	90	$1,01 \pm 0,18$	$4,5 \pm 0,6$	0,985
	95	$0,97 \pm 0,17$	$5,9 \pm 1,1$	0,995
	98	$1,1 \pm 1,1$	$6,7 \pm 1,8$	0,992
40	80	$1,01 \pm 0,15$	$2,3 \pm 0,3$	0,966
	85	$1,09 \pm 0,15$	$3,4 \pm 0,4$	0,969
	90	$0,9 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,9$	0,995
	95	$1,0 \pm 0,7$	$7,4 \pm 1,0$	0,993
	98	$1,2 \pm 1,0$	$8,2 \pm 1,2$	0,979

Parámetros cinéticos del ajuste al modelo de primer orden de la variación de la concentración relativa de HMF [HMF/HMF₀] en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a varias temperaturas.

Según se observa en la Tabla 5-34, para un mismo contenido en sólidos solubles, las constantes cinéticas aumentan con la temperatura de tratamiento. Si se fija una temperatura determinada, se observa que las constantes cinéticas aumentan con el contenido en sólidos solubles.

En la [Figura 5-62](#) se muestran las representaciones gráficas de la evolución de la concentración relativa de HMF en cremogenados de melocotón con un contenido en sólidos solubles de 11 y 20 °Brix tratados a distintas temperaturas y en la [Figura 5-63](#) las correspondientes a cremogenados de melocotón con un contenido en sólidos solubles de 30 y 40 °Brix.

Al objeto de correlacionar la variación de las constantes cinéticas con la temperatura, se han ajustado los valores de las constantes cinética de la [Tabla 5-34](#) a una expresión de tipo Arrhenius. Los valores de dicho ajuste se muestran en la Tabla 5-35.

Orden de reacción	Concentración (°Brix)	K_0 (min^{-1})	E_a (kJ/mol)	r^2
1	11	$(6,2 \pm 0,9) 10^8$	124 ± 35	0,983
	20	$(4,3 \pm 0,6) 10^{14}$	112 ± 29	0,988
	30	$(2,8 \pm 0,6) 10^{15}$	99 ± 29	0,982
	40	$(3,5 \pm 0,8) 10^9$	68 ± 26	0,994

Parámetros de la ecuación de Arrhenius resultantes de los ajustes de las constantes cinéticas del modelo de orden uno para la variación de la concentración relativa de HMF [HMF/ HMF₀] en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a varias temperaturas.

Los coeficientes de determinación obtenidos han sido relativamente elevados. Los valores de las energías de activación disminuyen con el contenido en sólidos solubles, y se encuentra dentro del rango considerado normal por González *et al.* (1988b), quienes afirman que, para zumos de frutas, las energías de activación asociadas a un modelo cinético de primer orden se sitúan en el rango de 15 a 30 kcal/mol (63 a 125 kJ/mol). Ibarz *et al.* (1989a), estudiando las cinéticas de formación de hidroximetilfurfural en concentrado de zumo de pera de 70,4 °Brix almacenado a diferentes temperaturas, obtuvieron una energía de activación de 80,7 kJ/mol. Toribio y Lozano (1987) al estudiar el efecto de la temperatura en la formación de HMF durante el tratamiento de zumo de manzana clarificado (15 a 70 °Brix) a altas temperaturas (100 a 108 °C), obtuvieron valores de energías de activación en el rango de 141 a 196 kJ/mol. Estos valores son relativamente elevados, y se encuentran por encima de los denominados como normales por González *et al.* (1988b), lo cual puede ser debido a las temperaturas de tratamiento tan elevadas que se han empleado en las experiencias.

11 Evolución de los azúcares durante el tratamiento térmico

En general, se observa una variación en el contenido de azúcares en función del tiempo y de la temperatura del tratamiento, así como del contenido en sólidos solubles de las muestras de cremogenado de melocotón. Esta variación resulta más acusada cuanto mayor es la temperatura y el contenido en sólidos solubles.

11.1 Sacarosa

La hidrólisis de la sacarosa se ha estudiado a partir de los datos experimentales, que expresan la concentración de la misma en cada uno de los tiempos de muestreo durante el tratamiento térmico. A partir de estos valores se han obtenido los valores de concentración de sacarosa relativa correspondientes [Sacarosa/Sacarosa₀], y se han ajustado a un modelo cinético de primer orden, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5-36.

Concentración (°Brix)	T (°C)	Ordenada origen	$k_1 10^3$ (min^{-1})	r^2
11	80	$1,03 \pm 0,13$	$1,23 \pm 0,14$	0,993
	85	$1,02 \pm 0,23$	$1,62 \pm 0,13$	0,989
	90	$1,05 \pm 0,24$	$2,51 \pm 0,09$	0,971
	95	$1,09 \pm 0,19$	$4,59 \pm 0,21$	0,980
	98	$1,0 \pm 0,5$	$5,21 \pm 0,09$	0,978
20	80	$0,99 \pm 0,16$	$1,80 \pm 0,15$	0,997
	85	$0,97 \pm 0,13$	$2,5 \pm 0,3$	0,995
	90	$1,05 \pm 0,24$	$4,0 \pm 0,4$	0,994
	95	$1,0 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,5$	0,997
	98	$1,1 \pm 0,7$	$8,6 \pm 1,1$	0,981
30	80	$1,00 \pm 0,16$	$2,14 \pm 0,09$	0,993
	85	$0,99 \pm 0,21$	$3,2 \pm 0,4$	0,998
	90	$1,0 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,4$	0,999
	95	$1,10 \pm 0,19$	$9,3 \pm 0,3$	0,997
	98	$1,1 \pm 0,6$	$12,5 \pm 0,8$	0,986
40	80	$1,04 \pm 0,24$	$2,3 \pm 0,4$	0,989
	85	$1,03 \pm 0,21$	$3,84 \pm 0,24$	0,990
	90	$1,09 \pm 0,15$	$6,4 \pm 0,9$	0,994
	95	$1,1 \pm 0,7$	$9,8 \pm 1,0$	0,995
	98	$1,7 \pm 0,6$	$16,1 \pm 1,2$	0,943

Parámetros cinéticos del ajuste al modelo de primer orden de la variación de la concentración relativa de sacarosa [$\text{Sacarosa} / \text{Sacarosa}_0$] en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a varias temperaturas.

En la [Figura 5-64](#), donde se representa la variación de la concentración relativa de sacarosa en cremogenado de 30 °Brix tratado a distintas temperaturas, así como los ajustes a cinéticas de orden uno, puede observarse de forma gráfica cómo la concentración de sacarosa en las muestras disminuye a medida que el tratamiento térmico se prolonga, y se aprecia cómo al aumentar la temperatura de tratamiento la desaparición de la sacarosa, por efecto de su hidrólisis, se hace mucho más acusada. Este efecto de la temperatura de tratamiento sobre la desaparición de la sacarosa se hace indiscutible al comparar la evolución de la sacarosa al ser tratada a 80 °C, donde la proporción de sacarosa hidrolizada, tras 480 minutos de tratamiento, representa aproximadamente el 60 % de la sacarosa inicial, frente a tratamientos más severos, como 98 °C, donde la sacarosa hidrolizada ha supuesto el 99 % de la sacarosa inicial.

Al objeto de cuantificar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de desaparición o hidrólisis de la sacarosa, se han ajustado las constantes cinéticas obtenidas para el modelo de orden uno a la ecuación de Arrhenius linealizada. Los valores de la energía de activación y del factor de frecuencia, así como los correspondientes coeficientes de determinación, obtenidos de los ajustes se muestran en la [Tabla 5-37](#). En la [Figura 5-65](#) se representan, de forma gráfica, los valores de $\ln k_1$ frente al inverso de la temperatura absoluta.

Orden de reacción	Concentración (°Brix)	K_0 (min^{-1})	E_a (kJ/mol)	r^2
1	11	$(1,4 \pm 0,7) 10^{17}$	113 ± 25	0,991
	20	$(2,6 \pm 0,8) 10^{16}$	108 ± 18	0,997
	30	$(1,7 \pm 0,2) 10^{14}$	94 ± 19	0,992
	40	$(6,9 \pm 1,0) 10^{13}$	93 ± 21	0,980

Parámetros de la ecuación de Arrhenius resultantes de los ajustes de las constantes cinéticas del modelo de orden uno para la variación de la concentración relativa de sacarosa [Sacarosa/Sacarosa₀] en cremogenados de melocotón de distintas concentraciones tratados a varias temperaturas.

Los coeficientes de determinación que se han obtenido para los ajustes han sido elevados, superiores a 0,990 exceptuando el correspondiente al cremogenado de melocotón de 40 °Brix, que ha sido de 0,980. De acuerdo con estos valores, puede afirmarse que el modelo de Arrhenius describe de forma conveniente el efecto de la temperatura sobre las cinéticas de desaparición de la sacarosa en cremogenado de melocotón tratado térmicamente.

[Tabla 5-37](#)

Los valores de la energía de activación han sido menores a medida que la concentración de las muestras de cremogenado de melocotón era mayor, y se han situado en el rango de 113-93 kJ/mol para el rango de concentraciones de 11 a 40°Brix. El factor de frecuencia ha presentado una tendencia similar disminuyendo al aumentar la concentración de las muestras de cremogenado.

De acuerdo con la tendencia que ha presentado la energía de activación cabe considerar que cuanto menor sea la concentración de las muestras de cremogenado tratado mayor será la influencia de la temperatura, o dicho de otro modo un incremento determinado de la temperatura de tratamiento tendrá una mayor influencia sobre la desaparición de sacarosa en cremogenado de 10 °Brix que en cremogenado de 40 °Brix.

11.2 Hexosas

Al analizar los valores experimentales de la evolución del contenido de hexosas (fructosa y glucosa) durante el tratamiento térmico de cremogenado de melocotón no se ha encontrado que sigan ninguna tendencia definida. En la [Figura 5-66](#) se representan de forma gráfica, y a modo de ejemplo, la variación de la concentración de glucosa en cremogenado de 30 °Brix tratado a distintas temperaturas, y en la [Figura 5-67](#) se representan los correspondientes a la fructosa, también para cremogenado de melocotón de 30 °Brix tratado a distintas temperaturas.

De forma general, se puede observar que, tanto el contenido de glucosa como el de fructosa en el cremogenado de melocotón experimentan un aumento inicial que, a lo largo del tratamiento térmico, tiende a estabilizarse. No obstante, la tendencia que presentan no es clara, y los ajustes que se han intentado a los distintos modelos propuestos no han dado resultados satisfactorios.

Como se ha comentado en el apartado 18.3. "Modelos cinéticos para la variación de azúcares" de la Introducción, para estudiar la variación de las hexosas durante el tratamiento térmico de cremogenado de melocotón, se han ensayado tres posibles modelos cinéticos. Sin embargo los resultados obtenidos no han presentado ninguna coherencia para ninguno de los modelos estudiados, ya que las constantes cinéticas toman valores positivos y negativos, por lo que no es posible afirmar que los modelos utilizados sean aplicables para describir la evolución de estos azúcares.

La cinética que siguen estos azúcares durante el tratamiento térmico del cremogenado

de melocotón es muy compleja. La sacarosa, que se hidroliza durante el tratamiento térmico del cremogenado, origina un aumento en el contenido de fructosa y glucosa, pero este aumento es contrarrestado por la desaparición de las dos hexosas, que forman parte de una reacción de deshidratación catalizada por los ácidos, para formar HMF (Resnik y Chirife, 1979; Petriella *et al.*, 1985). Ésta puede ser la causa de que, en ninguno de los modelos propuestos se hayan obtenido resultados lo suficientemente satisfactorios como para poder extraer conclusiones acertadas.

VI Conclusiones

Del análisis de los resultados presentados en el capítulo anterior pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

Caracterización reológica:

1- El comportamiento reológico del cremogenado industrial de melocotón, en el rango de temperaturas y concentraciones estudiadas, puede considerarse como pseudoplástico, y se puede describir según el modelo de la ley de la potencia.

El índice de comportamiento al flujo tiende a aumentar conforme aumenta la temperatura.

2- El efecto de la temperatura sobre la variación del índice de consistencia puede describirse mediante una ecuación tipo Arrhenius. Además, se observa que al aumentar el contenido en sólidos solubles del cremogenado aumenta también el valor de las energías de activación. Esto podría ser debido a su elevado contenido en fibra y pectinas.

El efecto de la concentración sobre la variación del índice de consistencia en cremogenado de melocotón es descrito satisfactoriamente por un modelo de tipo exponencial.

3.- De los diferentes modelos ensayados para describir el efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre la variación del índice de consistencia en cremogenado de melocotón, el que presenta mejores resultados es el que viene dado por la expresión:

Modelo 1:

$$K_{CI} = 0,016 \exp\left(1343 \frac{1}{T} + 0,122 C\right) \text{ (Pa.s}^n\text{)} \quad (1)$$

donde: K_{CI} es el índice de consistencia para el modelo 1 en Pa.s^n , T es la temperatura en Kelvin y C es la concentración del cremogenado de melocotón en $^{\circ}\text{Brix}$.

Caracterización Microbiológica:

4.- La especie aislada con mayor frecuencia en el cremogenado de melocotón, antes de la homogeneización y la pasteurización, ha sido *Bacillus badius*; en el producto acabado *Penicillium* sp., y en el producto alterado *Saccharomyces cerevisiae*.

5.- Debido a sus particulares características físico-químicas (pH, actividad de agua, contenido en azúcares y nutrientes) el cremogenado de melocotón constituye un medio de cultivo muy selectivo para la microflora que puede desarrollarse en él. Las levaduras y los son mohos los microorganismos mejor adaptados, aunque estos últimos no pueden desarrollarse adecuadamente debido a las condiciones de conservación y almacenamiento del cremogenado.

6.- Todas las muestras de cremogenado de melocotón alterado han presentado alteraciones típicas de ataque por levaduras. Además, las levaduras han demostrado su capacidad para alterar el cremogenado de melocotón estéril.

7.- La asociación microbiana alterante del cremogenado objeto de este estudio está formada por levaduras, existiendo indicios suficientes para proponer a la especie *Saccharomyces cerevisiae* como el principal agente alterante.

Cinéticas de Deterioro:

8.- El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de melocotón puede ser modelizado mediante una función de tipo Gompertz.

9.- La temperatura de incubación o de almacenamiento tiene una influencia decisiva sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cremogenado de melocotón, y por tanto sobre su alteración. La concentración inicial de levaduras en el cremogenado también influye en el grado de alteración del producto, de forma que cuanto mayor es la concentración inicial de levaduras en el cremogenado, más intensa es su alteración. Esta influencia de la concentración inicial de levaduras es más acusada a bajas temperaturas.

Se observa una clara relación entre el aumento de la población de *Saccharomyces cerevisiae* en el cremogenado y el descenso de los °Brix del mismo, provocado por un consumo de nutrientes, especialmente azúcares, por parte de las levaduras. Así, el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas provoca una disminución de los sólidos solubles del cremogenado, pero sin que, en ningún caso, el contenido final sea inferior a 5 °Brix.

A lo largo del proceso de alteración del cremogenado de melocotón por *Saccharomyces cerevisiae*, no se observan variaciones apreciables en el pH del producto.

10.- Las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas han mostrado una mayor sensibilidad térmica en cremogenado de melocotón, con unos valores D_{60} de 0,53, 0,20 y 0,10 min. para las cepas 26, 99 y 204 respectivamente.

El pH del medio de tratamiento no ha influido de forma significativa sobre la termorresistencia de las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiadas.

El medio de tratamiento no ha influido significativamente en los valores z , que ha variado entre 3,2 (cepa 26 en cremogenado de melocotón) y 5,9 (cepa 204 en cremogenado de melocotón).

11.- La velocidad de pardeamiento no enzimático se ve incrementada con la concentración y la temperatura de tratamiento. Sin embargo, cuando la temperatura de tratamiento es elevada, un aumento del contenido de sólidos solubles no siempre supone un aumento de la velocidad de pardeamiento.

12.- El comportamiento de los distintos parámetros colorimétricos estudiados ha sido el siguiente:

- La absorbancia a 420 nm de la fracción líquida del cremogenado de melocotón aumenta al aumentar la concentración y la temperatura de tratamiento, siguiendo una cinética que puede ser explicada tanto por un modelo de orden cero como de orden uno.

- La relación existente entre las coordenadas a^* y b^* indica un claro predominio de tonos rojos y amarillos en el color del cremogenado de melocotón. Las coordenadas a^* y b^* tienden a disminuir con el tiempo de tratamiento, y con el incremento de la temperatura y la concentración del cremogenado.

- La luminosidad, L^* , varía en el tiempo según un modelo cinético exponencial. Aunque, en las condiciones estudiadas también es válido un modelo lineal.

- La evolución de la diferencia de color, ΔE^* , es explicada por el modelo cinético combinado.

- La diferencia de croma, ΔC^* , en las condiciones estudiadas, se ajusta a un modelo combinado cuando la concentración y la temperatura de tratamiento son elevadas. En el resto de los casos el modelo cinético de orden cero se ajusta mejor.

- El índice de pardeamiento descrito por Buera, no ha resultado adecuado para describir el pardeamiento no enzimático que tiene lugar en cremogenado de melocotón durante su tratamiento térmico.

13.- Todos los parámetros analizados han mostrado una dependencia de la temperatura que puede ser expresada según una ecuación de tipo Arrhenius. En la mayoría de los casos estudiados, y para modelos cinéticos sencillos, la energía de activación toma valores inferiores cuanto mayor es la concentración del cremogenado. Por tanto, una disminución del

contenido en sólidos solubles supone un mayor efecto de la temperatura en la velocidad de pardeamiento. Los valores de E_a obtenidos están dentro del rango de 58 a 148 kJ/mol.

14.- La velocidad de formación de HMF aumenta con la temperatura de tratamiento y el contenido en sólidos solubles, y puede ser descrita por una cinética de primer orden. Las constantes cinéticas de la reacción de formación de HMF evolucionan en función de la temperatura, siguiendo un modelo de Arrhenius. Los valores de E_a obtenidos están dentro del rango de 68 a 124 kJ/mol.

15.- La velocidad de hidrólisis de la sacarosa aumenta con el contenido en sólidos solubles y la temperatura de tratamiento, y puede describirse mediante una cinética de primer orden. Por el contrario, las hexosas (fructosa y glucosa) no se ajustan a ninguno de los modelos propuestos.

De forma general, puede concluirse que el pardeamiento no enzimático en el cremogenado de melocotón aumenta con el contenido en sólidos solubles y con la temperatura de tratamiento. Además, existe una clara dependencia entre las constantes cinéticas de pardeamiento no enzimático y la temperatura de tratamiento, que puede expresarse según el modelo o ley de Arrhenius.

VII Bibliografía

- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. Volume two. 15th. Edn. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- ALEIXANDRE, J. L. y SERRANO, P. 1989. Influencia del grado de madurez en el contenido de hidroximetilfurfural en zumo de manzana. *Alimentación equipos y tecnología*. Septiembre-Octubre 1989. 83-86.
- ALIMARKET. 1994. Los zumos buscan valor añadido. *Alimarket*. Mayo, 149-156.
- AREF, H. y CRUESS, W. V. 1934. An investigation of the thermal death point of *Saccharomyces ellipsoideus*. *J. Bact.* 27, 443-452.
- ARTIGAS, J. M.; GIL, J. C. y FELIPE, A. 1985. El espacio uniforme de color CIELAB. Utilización. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 25, 316-320.
- ASHOOR, S. H. y ZENT, J. B. 1984. Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.* 49, 1206-1207.
- BABSKY, N. E.; TORIBIO, J. L. y LOZANO, J. E. 1986. Influence of storage on composition of clarified apple juice concentrate. *J. Food Sci.* 51, 564-567.
- BAIRD, A. C. 1983. Ácidos orgánicos. En "Ecología microbiana de los alimentos 1. Vol I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos." I.C.M.S.F. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Editorial Acribia. Zaragoza.
- BAIRD, A. C. y KOOIMAN, W. J. 1985. Bebidas no alcohólicas, zumos de frutas naturales, concentrados y mermeladas. En "Ecología microbiana de los alimentos 2. Vol. II. Productos alimenticios." I.C.M.S.F. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Editorial Acribia. Zaragoza.
- BAISIER, W. M. y LABUZA, T. P. 1992. Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agr. Food Chem.*, 40, 707-713.
- BALTES, W. 1982. Chemical changes in food by the Maillard reactions. *Food Chem.* 9, 59-65.
- BARANYI, J.; McCLURE, P. J.; SUTHERLAND, J. P. y ROBERTS, T. A. 1992. Modeling bacterial growth responses. Presented at the Society for Industrial Microbiology. April, 12-15. Tampa. Florida.
- BARBANTI, D.; MASTROCOLA, D. y LERICI, C. R. 1990. Early indicators of chemical changes in foods due to enzymatic or non enzymic browning reactions. Part II: Colour changes in heat treated model systems. *Lebensm. Wiss. Technol.* 23, 494-498.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. y PELEG, M. 1983. Flow parameters of selected commercial semi-liquid food products. *J. Texture Stud.* 14, 213-234.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; IBARZ, A y PELEG, M. 1993. Propiedades reológicas de alimentos fluidos. Revisión. *Alimentaria*. 241, 39-89.
- BARILLERE, J. M.; BIDAN, P. y DUBOIS, C. 1983. Thermorésistance ses levures et ses bactéries lactiques isolées de vin. *Bull. O.I.V.* 56, 327-351.
- BARNETT, H. L and HUNTER, B. B. 1973. Illustrated genera of imperfecti fungi. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA.
- BARRITT, M. M. 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of a-naphthol. *J. Path. Bact.*, 42, 441-448.
- BEAMAN, T. C. y GERHARDT, P. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1242-1246.
- BELITZ, H. D. y GROSCH, W. 1985. Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza.
- BEM, Z.; HECHELMANN, H y LEISTNER, L. 1976. The bacteriology of DFC-meat.

- Fleischwirtschaft*. 56, 985-987.
- BENZING-PURDIE, L. M.; RIPMEESTER, J. A. y RATCLIFFE, C. I. 1985. Effects of temperature on Maillard reaction products. *J. Agr. Food Chem.* 33, 31-39.
- BERGER, M. A.; RICHARD, N. y CHEFTEL, J. C. 1982. Influence de l'activité de l'eau sur le thermorésistance d'une levure osmophile: *Saccharomyces rouxii*, dans un aliment à humidité intermédiaire. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 15, 83-88.
- BERRY, J. M. 1979. Yeasts problems in the food and beverage industry. En "Food mycology". Rhodes, M. E. (Ed.). Hall Company. Boston, USA.
- BEUCHAT, L. R. 1978. Food and beverage mycology. AVI Publishing Company. Westport, USA.
- BEUCHAT, L. R. 1981a. Synergistic effects of potassium sorbate and benzoate on thermal inactivation of yeasts. *J. Food Sci.* 46, 771-775.
- BEUCHAT, L. R. 1981b. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate on inactivating yeasts heated in broths containing sodium chloride and sucrose. *J. Food Prot.* 44, 765-769.
- BEUCHAT, L. R. 1982a. Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *J. Food Sci.* 47, 1679-1682.
- BEUCHAT, L. R. 1982b. Effects of environmental stress in recovery media on colony formation by sublethally heat-injured *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78, 536-540.
- BEUCHAT, L. R. 1983a. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *J. Food Prot.* 46, 135-141, 150.
- BEUCHAT, L. R. 1983b. Combined effects of food preservatives and organic acids on thermal inactivation of yeasts in fruit juices. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 16, 51-54.
- BEUCHAT, L. R. 1987. Thermal tolerance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. *Abstr. Annu. Meeting American Society for Microbiology*. N° P-33. 280.
- BEUCHAT, L. R. y LECHOWICH, R. V. 1968. Effect of salt concentration in the recovery medium on heat injured *Streptococcus faecalis*. *Appl. Microbiol.* 16, 772-776.
- BEVERIDGE, T. y HARRISON, J. E. 1984. Nonenzymatic browning in pear juice concentrate at elevated temperatures. *J. Food Sci.* 49, 1335-1340.
- BEVERIDGE, T. y HARRISON, J. E. 1987. Nonenzymatic browning in pear juice concentrate at elevated temperatures. *J. Food Sci.* 49, 1335-1340
- BEVERIDGE, T.; FRANZ, K. y HARRISON, J. E. 1986. Clarified natural apple juice: production and storage stability of juice and concentrate. *J. Food Sci.* 51, 401-414, 433.
- BEVERIDGE, T.; FRANZ, K. y HARRISON, J.E. 1987. Storage browning of pear juice concentrate. *Can. Inst Food Sci. Technol.* 20, 170-172.
- BHADURI, S.; TURNER-JONES, C. O.; BUCHANAN, R. L. y PHILLIPS, J. G. 1994. Response surface model of the effect of pH, sodium chloride and sodium nitrite on growth of *Yersinia enterocolitica* at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 333-343.
- BHAJEKAR, D. V. y KULKARNI, P. R. 1991. Osmotolerant yeast isolates from fruit preserves. *Die Nahrung.* 35, 99-101.
- BIDAN, P. 1986. Emploi de la chaleur pour la stabilisation microbienne du vin. *Industrie delle bevande*. Abril, 113-126, 130.
- BIGELOW, W. D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 29, 528-536.
- BOE (*Boletín Oficial del Estado*) de 20 de noviembre de 1991. Reglamentaciones técnico-sanitarias. Real Decreto 1650/1991 de 8 de noviembre. 278, 37555-37559.

- BOGER, D. V. y TIU, C. 1974. Rheological properties of food products and their use in the desing of flow systems. *Food Technol. in Australia*, 26, 325-335.
- BONDI, A. 1956. Theories of viscosity. En "Rheology, Vol. I". Ed. Eirich, F. R. Academic Press. New York. U.S.A.
- BOOTH, C. 1977. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England.
- BORWANKAR, R. P.; FRYE, L. A.; BLAYROCK, A. E. y SASEVICH, F. J. 1992. Rheological characterization of melting of margerines and tablespreads. *J. Food. Eng.*, 16, 55-74.
- BOURNE, M. C. 1992. Calibration of rheological techniques used for foods. *J. Food Eng.* 16, 151-163.
- BRAVERMAN, J. B. S. 1967. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Editorial Omega. Barcelona.
- BRODKEY, R. S. 1967. The fenomema of fluid motions. Addison-Wesley Publ. Co., Reading. Massacchusets.
- BROWN, M. R. W. y MELLING, J. 1971. Inhibition and destruction of microorganisms by heat. En "Inhibition and destruction of the microbial cell". Hugo, W. B. (Ed.) Academic Press. New York.
- BUCHANAN, R. L. 1991. Predictive microbiology: mathematical modelling of microbial growth in foods. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 484, 250-260.
- BUCHANAN, R. L. y BAGI, L. K. 1994. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 317-332.
- BUERA, M. P., LOZANO, R. D. Y PETRIELLA, C. 1985. Definition of color in the non-enzymatic browning process. *Die Farbe* 32, 316-326.
- BUERA, M. P.; CHIRIFE, J.; RESNIK, S. L. y LOZANO, D. R. 1987a. Nonenzimatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to caramelization of various single sugars. *J. Food Sci.* 52, 1059-1062.
- BUERA, M. P.; CHIRIFE, J.; RESNIK, S. L. y WETZLER, G. 1987b. Nonenzimatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning. *J. Food Sci.* 52, 1063-1067.
- C.O.C.I. de Lleida. 1993. Situació actual i perspectives de futur del sector de la fruita a Lleida. Cambra Oficial de Comerç i Industria de Lleida. Lleida.
- CARBONELL, E.; COSTELL, E y DURAN, L. 1990. Comportamiento reológico de los productos derivados de fruta. Flujo, dependencia del tiempo y plasticidad. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 2, 189-209.
- CARDONA, A.; CASTELO, M.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R y GÓMEZ, R. 1992. Zumos de fruta. Principios generales de elaboración y estabilidad. *Alimentaria*. Abril, 53-56.
- CASAS, A. 1979. Frutas. En "Química agrícola III. Alimentos". Primo, E. Editorial Alhambra. Madrid.
- CENZANO, J. M.; MADRID, J. M. y MADRID, R. 1989. Aditivos y coadyuvantes en la elaboración de zumos de frutas. *Alimentación, equipos y tecnología*. Marzo-Abril, 181-185.
- CHARM, S. E. 1960. Viscosimetry of non-newtonian food materials. *Food Research.* 25, 351-362.
- CHARM, S. E. 1963. The direct determination of shear stress-shear rate behaviour of foods in the presence of a yield stress. *J. Food.*, 28, 107-113.
- CHEFTEL, J. C. y CHEFTEL, H. 1980. Introducción a la bioquímica y tecnología de los

- alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza..
- CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. y BESANCON, P. 1982. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol. II. Editorial Acribia. Zaragoza.
- CHICHESTER, D. F. y TANNER, F. W. 1972. Antimicrobial food aditives. En "Handbook of food aditives". Furia, T. E. (Ed). Chem. Rubber Publ. Co. Cleveland, Ohio.
- CHIRIFE, J. y BUERA, M. P. 1994. Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated/semimoist food systems. *J. Food Eng.* 59, 921-927.
- CHRISTENSEN, M. 1981. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia.* 73, 1056-1084.
- CHRISTENSEN, W.B. 1946. Urea decompositon as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bact.* 52, 461-467.
- CLARK, D. S. y TAKÁCS, J. 1983. Los gases como conservadores. En " Ecología microbiana de los alimentos 1. Vol I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos." I.C.M.S.F. (International Commision on Microbiological Specifications for Foods). Editorial Acribia. Zaragoza.
- CLEGG, K. M. 1964. Non-enzymic browning of lemon juice. *J.Sci. Food Agr.* 15, 878-885.
- CLYDESDALE, F. M. y FRANCIS, F. J. 1985. Pigmentos. En " Introducción a la ciencia de los alimentos." Fennema, O R. (Ed.).Editorial Reverté. Barcelona.
- COLE, J. 1967. The Maillard reaction in food products: carbon dioxide production. *J. Food Sci.* 32, 245-250.
- CONDÓN, S.; BAYARTE, M. y SALA, F. J. 1992a. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 251-256.
- CONDÓN, S.; GARCÍA, M. L.; OTERO, A. y SALA, F. J. 1992b. Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 322-326.
- CONDÓN, S.; LÓPEZ, P.; ORIA, R. y SALA, F. J. 1989. Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer. *J. Food Sci.* 54, 451-457.
- CORLETT, D. A. y BROWN M. H. 1983. pH y acidez. En "Ecología microbiana de los alimentos 1. Vol. I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos." I.C.M.S.F. (International Commision on Microbiological Specifications for Foods). Editorial Acribia. Zaragoza.
- CORNWELL, C. J. y WROLSTAD, R. E. 1981. Causes of browning in pear juice concentrate during storage. *J. Food Sci.* 46, 515-518
- CORRY, J. E. L. 1976. The effect of sugars on the heat resistance and morphology of osmotolerant yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 40, 269-275.
- COSTELL, E. y DURAN, L. 1978. Evaluación and cuantificación de la tixotropía del puré de albaricoque. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.* 18, 470-484.
- COSTELL, E.; CARBONELL, E. y DURAN, L. 1986. Comportamiento reológico de las mermeladas de fresa. Relación con la composición. *Alimentos.* 2, 5-12.
- COSTELL, E.; CLEMENTE, G. y DURAN, L. 1982. Reología físico química del puré de albaricoque. II. Caracterización del flujo y relación entre los parámetros reológicos y las características químicas y físicas del producto. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.* 4, 539-550.
- CRYALL, P. G.; CHEN, C. S. y CARTER, R. D. 1982. Models for predicting viscosity of orange juice concentrate. *Food Technol.* May, 245-252
- CURRAN, H. R. 1935. The influence of some environmental factors upon the thermal resistance of bacterial spores. *J. Infect. Dis.* 56, 196-202.
- D.A.R.P. 1993. Estadistiques agràries i pesqueres de Catalunya. Any 1992. Estadística i

- conjuntura agrària. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. Gabinet Tècnic. Barcelona.
- DALGAARD, P.; ROSS, T.; KAMPERMAN, L.; NEUMEYER, K y McMEEKIN. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 391-404.
- DANEHY, J. P. y WOLNAK, R. E. 1983. Maillard technology: manufacturing applications in food products. *ACS Symp. Series.* 215, 303-306.
- DAWSON, R. M. C.; ELLIOT, D. C.; ELLIOT, W. H. y JONES, K. M. 1969. Data for Biochemical Research. Clarendon Press, Oxford.
- DEAK, T. y BEUCHAT, L. R. 1993. Yeasts associated with fruit juice concentrates. *J. Food Prot.* 56, 777-782.
- DEAK, T. y BEUCHAT, L.R. 1987. Identification of foodborne yeasts. *J. Food Prot.* 50, 243-264
- DEVEZE, M. y RIBEREAU-GAYON, P. 1977. Thermorésistance des levures dans le vin. Application à la stabilisation biologique des vins par la chaleur. *Conn. Vigne Vin.* 11, 131-163.
- DRAGONI, I. y COMI, G. 1985. Presenza di muffe e lieviti in succhi di frutta prodotti industrialmente. *Ind. Bevande.* 14, 599-606.
- DURÁN, L. 1978. El color en tecnología de alimentos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 20, 1-12.
- EICHNER, K y CINER-DORUK, M. 1981. Early indication of the Maillard reaction by analysis of reaction intermediates and volatile decomposition products. *Progress Food Nutrition Sci.* 5, 115-135.
- EICHNER, K. y KAREL, M. 1972. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *J. Agr. Food Chem.* 20, 218-223.
- ELLIKER, P. R. y FRAZIER, W. C. 1938. Influence of time and temperature of incubation on heat resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 36, 83-98.
- ESTY, J. R. y MEYER, K. F. 1922. The heat resistance of spores of *B. botulinus* allied anaerobes. *J. Infect. Dis.* 31, 650-663.
- FEATHER, M. S. 1982. Sugar dehydration reactions. En: "Food Carbohydrates." Lineback, D. P. y Inglett, G. E. (Eds.). Avi Pub. Connecticut.
- FEIG, S. y STERSKY, A. K. 1981. Characterization of a heat-resistant strain of *Bacillus coagulans* isolated from cream style canned corn. *J. Food Sci.* 46, 135-137.
- FIGONI, P.I. y SHOEMAKER, C.F. 1983. Characterization of time dependent flow properties on mayonnaise under steady shear. *J. Texture Stud.* 14, 431-442.
- FINOT, P. A. y MAURON, J. 1969. Le blocage de la lysine par la réaction de Maillard. I. Synthèse de N-(desoxy-1-D-fructosyl-1) et N-(desoxy-1-D-lactulosyl-1)-L-lysines. *Helv. Chem. Acta.* 52, 1488-1495.
- FISZMAN, S. M.; COSTELL, E. y DURAN, L. 1984. Medida del comportamiento reológico de geles de pectina de alto metoxilo con un reómetro de cono-placa. Relación con la composición. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 2, 191-198.
- FORD, E. W. y STEFFE, J. E. 1986. Quantifying thixotropy in starch-thickened, strained apricots using mixer viscometry techniques. *J. Texture Stud.* 17, 71-85.
- FOX, M.; LONCIN, M. y WEISS, M. 1983. Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the velocity of the Maillard reaction in foods. *J. Food Qual.*, 6, 103-118.
- FRANK, H. K. 1968. Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. *J. Food Sci.* 33, 89-100.
- GALLEGOS, C; BERJANO, M.; GARCIA, F.P.; MUÑOZ, J. y FLORES, V. 1988.

- Destrucción estructural con la cizalla en mayonesas. En "Actas del VII Congreso Nacional de Química. Sevilla. Vol. III, 221-228.
- GARCÍA, R. y BURÓN, I. 1980. Relación entre la estructura y las propiedades reológicas de los zumos y purés de frutas y hortalizas. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 20, 70-78.
- GARZA, S; GINER, J.; MARTÍN, O; COSTA, E y IBARZ A. 1996. Evolución del color, azúcares y HMF en el tratamiento térmico de zumo de manzana. *Food Sci. Technol. Inter.* 2, 44-52 (En prensa).
- GEKAS, V. 1992. Transport phenomena of foods and biological materials. CRC Press. Boca Ratón, Fla. U.S.A.
- GHAZALA, S.; RAMASWAMY, H. S.; VAN DE VOORT, F. R y AL-KANANI, T. 1991. Kinetics of color development in aqueous systems at high temperatures. *J. Food Engin.* 260, 79-89.
- GHERARDI, S.; CASTALDO, D. y TRIFIRO, A. 1985. Effect of liquefying enzymes on pear purees: Relationships between analytical composition and rheological properties. *Fluess. Obst.*, 12, 653-656.
- GIBSON, A. M. y ROBERTS, T. A. 1986. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonellae* in a laboratory medium. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 183-194.
- GIBSON, A. M; BRATCHELL, N. y ROBERTS, T. A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 479-490.
- GIBSON, B. 1973. The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 36, 365-376.
- GIBSON, T. y ABD- EL- MALEK, Y. 1945. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14, 35-41.
- GONZÁLEZ, C; IBARZ, A y VICENTE, M. 1988a. Cinética de pardeamiento no enzimático de concentrado de zumo de melocotón. *Alimentaria.* 197, 63-68.
- GONZÁLEZ, C; IBARZ, A; ESPLUGAS, S. y VICENTE, M. 1988b. Cinética de pardeamiento no enzimático en zumos de frutas. *Alimentaria.* 198, 53-60.
- GORBATOV, A. V. y GORBATOV, V. M. 1974. Advances in sausage meat rheology. *J. Texture Stud.*, 4, 406-437.
- GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. and PANG, C.H.-N. 1973. The genus *Bacillus*. Handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- GUNJAL, B. B. y WAGHMARE, N. J. 1987. Flow characteristics of pulp, juice and nectar of Baneshan and Neelum mangoes. *J. Food Sci. Technol. India.* 24, 20-23.
- GUZMÁN, G; CORBALÁN, A; LAENCINA, J; NUÑEZ, J. M. y GUZMÁN, G. 1986. HMF, indicador de modificaciones indeseables en cremogenados de albaricoque. *Alimentación, equipos y tecnología.* Noviembre-diciembre, 73-77.
- HAAKE. 1983. Instruction manual Rotovisco RV12. Haake Mess-Technik GmbH u. Co. Dieselstrasse. Alemania.
- HAHN, S. J.; REE, T. y EYRING, H. 1959. Flow mechanism of thixotropic substances. *Ind. Eng. Chem.* 51, 856-857.
- HANSEN, N. H. y RIEMANN, H. 1963. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 26, 314-333.
- HARPER, J. C. y EL-SAHRIGI, A. F. 1965. Viscosimetric behaviour of tomato concentrates. *J. Food Sci.* 30, 470-476.
- HARPER, J. C. y LEBERMANN, K. W. 1962. Rheological behaviour of pear purees. *Proc. 1st Int. Congress Food Sci. Technol.* 1, 719-728.

- HARRIGAN, W. F. y McCANCE, M. E. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Editorial Academia. León.
- HERNANDEZ, J. y DUBÓN, F. 1987. Sistemática Bacteriana. 2ª Edición. Centro editorial de servicios y publicaciones universitarias. Valencia.
- HIGGS, S. J. y NORRINGTON, R. J. 1971. Rheological properties of selected foodstuffs. *Process Biochem.* 615, 52-54.
- HODGE, J. E. 1953. Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agr. Food Chem.* 15, 928-943
- HOLDSWORTH, S. D. 1971. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid foods products. *J. Texture Stud.* 2, 393-418.
- HOLDSWORTH, S. D. 1987. Conservación de frutas y hortalizas. Editorial Acribia. Zaragoza.
- HOSENEY, R. C. 1984. Chemical changes in carbohydrates produced by thermal processing. *J. Chem. Educ.* 61, 308-312
- HURST, A.; HUGHES, A. y COLLINS-THOMPSON, D. L. 1974. The effect of sublethal heating on *Staphylococcus aureus* at different physiological ages. *Can. J. Microbiol.* 20, 765-768.
- IBARZ, A. 1989. El color como parámetro de caracterización de alimentos. *TheknoS*, 112, 48-52.
- IBARZ, A. 1993. Rheology of salted egg yolk. *J. Texture Stud.* 24, 63-71.
- IBARZ, A. y BERMEJO, M. L. 1991. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre zumos concentrados de pera. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 31, 195-204
- IBARZ, A. y CASERO, T. 1987. Reología de zumos de manzana de diferente variedad. *Alimentaria*. Septiembre, 57-59.
- IBARZ, A. y LOZANO, J. E. 1992. Nota. Caracterización reológica de pulpas concentradas de ciruela y melocotón. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 22, 539-549.
- IBARZ, A. y NAVÉS, J. 1995. Efecto de la temperatura y contenido en sólidos solubles sobre la cinética de pardeamiento no enzimático de zumos clarificados de manzana. *Food Sci. Technol. Inter.* 1, 29-34.
- IBARZ, A. y ORTIZ, M. J. 1993. Reología de zumos de melocotón. *Alimentación, equipos y tecnología*. Octubre, 81-86.
- IBARZ, A y PAGAN, J. 1987a. Rheology of raspberry juices. *J. Food Eng.* 6, 269-289.
- IBARZ, A y PAGAN, J. 1987b. Consideraciones reológicas sobre zumo de frambuesa. *Alimentación, equipos y tecnología*. Mayo-junio, 175-182.
- IBARZ, A. y SINTES, J. 1989. Rheology of egg yolk. *J. Texture Stud.* 20, 161-167.
- IBARZ, A., CASERO, T., MIGUELSANZ, R. y PAGAN, J. 1989a. Cinéticas de formación de hidroximetilfurfural en concentrado de zumo de pera almacenado a distintas temperaturas. *Alimentaria* 199, 81-84
- IBARZ, A., CASERO, T., MIGUELSANZ, R. y PAGAN, J. 1989b. Cinética de pardeamiento no enzimático de concentrado de zumo de pera almacenado a distintas temperaturas. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 29, 407-413
- IBARZ, A., CASERO, T., MIGUELSANZ, R. y PAGAN, J. 1989c. Efecto de la temperatura en la cinética de pardeamiento no enzimático en zumos clarificados de pera con diferente contenido en sólidos solubles. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 29, 530-537
- IBARZ, A.; GINER, J.; PAGAN, J.; GIMENO, V. y GARZA, S. 1995. Rheological behaviour of kiwi fruit juice concentrates. *J. Texture Stud.* 26, 137-145.
- IBARZ, A.; GONZALEZ, C.; ESPLUGAS, S. y VICENTE, M. 1992. Rheology of clarified fruit juices. I: Peach juices. *J. Food Eng.* 15, 49-61.
- IBARZ, A.; MIGUELSANZ, R. y PAGÁN, J. 1993. The effect of high temperatures on

- nonenzymatic browning and formation of HMF in clarified peach juices. *Fruit processing*. July, 262-265.
- IBARZ, A.; PAGAN, J; GUTIERREZ, J y VICENTE, M. 1989. Rheological properties of clarified pear juice concentrates. *J.Food Eng.* 10, 57-63.
- IBARZ, A.; PAGAN, J; MIGUELSANZ, R. 1991. Rheology of clarified fruit juices I: Peach juices. *J.Food Eng.* 12, 63-73.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1985. Ecología microbiana de los alimentos 2. Vol. II. Productos alimenticios. Editorial Acribia. Zaragoza.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1983. Microorganismos de los alimentos, 1. Técnicas de análisis microbiológico. Editorial Acribia, Zaragoza.
- ILICALI, C. 1985. Correlations for the consistency coefficients of apricots and pear purees. *J. Food Eng.* 8, 47-51.
- INGRAM, M. y LUTHI, H. 1961. Microbiology of fruit juices. En " Fruit and vegetable juice, process technology". Tressler, D. K. y Joslyn, M. A. (Eds.). AVI. Westport. Connecticut.
- JERMINI, M. F. G. y SCHMIDT-LORENZ, W. 1987. Heat resistance of vegetative cells and asci of two *Zygosaccharomyces* yeasts in broths at different water activity values. *J. Food Prot.* 50, 835-841.
- JERMINI, M. F. G.; GEIGES, O. y SCHMIDT-LORENZ, W. 1987. Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J. Food Prot.* 50, 468-472.
- JHONSON, J. R., BRADDOCK, R. J. y CHEN, C. S. 1995. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *J. Food Sci.*, 60, 502-505.
- JIMÉNEZ, L.; FERRER, J. L. y GARCIA, I. 1987. Modelos reológicos para líquidos alimentarios. Alimentación, equipos y tecnología. Enero-Febrero, 295-299.
- JIMÉNEZ, L.; GARCIA, J. y FERRER, J. L. 1988. Dependencia del tiempo and de la temperatura en las constantes reológicas del zumo de tomate. *Afinidad*. 415, 239-242.
- JONES, D. 1975. A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 52-59.
- JOSLYN, M. A. 1957. Role of aminoacids in the browning of orange juice. *Adv. Food Res.* 22, 1-14
- JUVEN, B. J.; KANNER, J. y WEISSLOWICZ, H. 1978. Influence of orange juice composition on the thermal resistance of spoilage yeasts. *J. Food Sci.* 43, 1074-1076.
- KANNER, J.; FISHBEIN, J.; SHALOM, P.; HAREL, S. y BEN-GERA, I. 1982. Storage stability in orange juice concentrate packaged aseptically. *J. Food Sci.* 14, 429-431.
- KAREL, M. 1984. Chemical effects in food stored at room temperature. *J. Chem. Educ.* 61, 335-339.
- KHALIL, K. E.; RAMAKRISHNA, P.; NANJUNDASWAMY, A. M. y PATWARDHAN, M. V. 1989. Rheological behaviour of clarified banana juice: effect of temperature and concentration. *J. Food Eng.* 10, 231-240.
- KING, A. D. y BOLIN, H. R. 1989. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 43, 132-135.
- KING, A. D.; BAYNE, H. G. y ALDERTON, G. 1979. Nonlogarithmic death rate calculation for *Byssochlamys fulva* and others microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 596-602.
- KOCH, A.L. 1981. Growth measurement. En "Manual of methods for general bacteriology".

- Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Costilow, R. N.; Nester, E. W.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. and Phillips, G. B. (Eds.). American Society for Microbiology. Washintong, DC. USA.
- KOKINI, J. L. 1985. Fluid and semi-solid texture y texture-taste interactions. *Food Technol.*, 39, 86-94.
- KOKINI, J. L. 1992. Rheological properties of foods. En "Handbook of food engineering". Heldman, D. R. y Lund, D. B. Eds. Marcel Dekker. New York. pp. 1-38.
- KOKINI, J. L. y DICKIE, A. 1981. An attempt to identify and model trasient viscoelastic flow in food. *J. Texture Stud.* 12, 539-557.
- KOOIMAN, W. J. 1977. Microbiological aspects of soft drinks and fruit spreads. En "Ecología microbiana de los alimentos 2. Vol. II. Productos alimenticios." I.C.M.S.F. (International Commision on Microbiological Specifications for Foods). Editorial Acribia. Zaragoza.
- KRAMER, A. y TWIGG, B. A. 1970. Quality control for the foods industry, Vol. 1, AVI Publishing Co., Westport, Connecticut. U.S.A.
- KREGER-van RIJ, N.J.W. 1964. A taxonomic study of the yeast genera *Endomycopsis*, *Pichia* and *Debaryomyces*. Tesis doctoral. Leiden. Holanda.
- KREGER-van RIJ, N.J.W. 1984. The yeasts. A taxonomic study. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Holanda.
- KRIEG, N.R. y HOLT, J.G.(Eds.). 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- LABADIE, J.; FOURNAUD, J. y DUMONT, B. L. 1975. Relations entre le pH et la microflore des viandes hachees de bovins. *Ann. Technol. Agric.* 24, 193-203.
- LABUZA, T. P. 1972. Nutrient losses during drying and storage of dehydrated foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, 3, 217-223.
- LABUZA, T. P. 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technol.* 34, 36-41, 59.
- LABUZA, T. P. y RIBOH, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technol.* 36, 66-72.
- LABUZA, T. P. y SALTMARCH, M. 1981. Kinetics of browning and quality loss in whey powders during steady state and non-steady state storage conditions. *J. Food Sci.* 47, 82-95.
- LEE, H. S. y NAGY, S. 1988. Relationship of sugar degradation to detrimental changes in citrus juices quality. *Food Technol.* November, 91-97.
- LONCIN, M.; BIMBENET, J. J. y LENGES, J. 1968. Influence of the activity of water on the spoilae of foodstuffs. *J. Food Technol.* 3, 131-142.
- LOZANO, J. E. 1985. Influencia del procesamiento sobre las propiedades del zumo de manzana concentrado. *Informe anual del CONICET*, Plapiqui, Bahía Blanca, Argentina.
- LOZANO, J. E. 1991. Kinetics of non enzymatic browning in model sistemas simulating clarified apple juice. *Lebensm. Wiss Technol.* 24, 355-360.
- LOZANO, J. E. y IBARZ, A. 1992. Nota. Caracterización reológica de pulpas concentradas de ciruela y melocotón. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 32, 85-94.
- LOZANO, J. E.; DRUDIS,R. y IBARZ, A. 1994. Enzymatic browning in apple pulps. *J. Food Sci.* 59, 564-567.
- LUBIENIECKI- von SCHELHORN, M. 1973. Influence of relative humidity conditions on the thermal resistance of several kinds of spores of moulds. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.* 2, 163-171.
- MAILLARD, L. C. 1912. Action des acides aminés sur les sucres: formation des melaniodes

- par voie méthodique. *Comptes Rendus Acad. Sci.* 154, 66-68.
- MAN, J. C. de; ROGOSA, M. y SHARPE, M. E. 1960. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 23, 130-143.
- MANOHAR, B.; RAMAKRISHNA, P. y UDAYASANKAR, K. 1991. Some physical properties of tamarind (*Tamarindus indica* L.) juice concentrates. *J. Food Engineering.* 13, 241-258.
- MAPA 1993. Métodos oficiales de análisis de zumos de frutas, otros vegetales y sus derivados. En Métodos oficiales de análisis. Tomo I. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- MAPA 1994. Anuario de Estadística Agraria 1992. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica. Madrid.
- MARCHETTI, R.; CASADEI, M. A. y GUERZONI, M. E. 1992. Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. *Ital. J. Food Sci.* 2, 97-108.
- MARCY, J.; GRAUMLICH, T.; CRANDALL, P. y MARSHALL, M. 1984. Factors affecting storage of orange concentrate. *J. Food Sci.* 49, 1628-1629.
- MARINÉ, A. 1982. El pardeamiento y el color de los alimentos. *Alimentaria.* 136, 13-30.
- MARKAKIS, P.; LIVINGSTON, G. E. y FELLERS, C. R. 1957. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation. *Food Res.* 22, 117-129.
- MARSHALL, C. R. y WALKLEY, V. T. 1952. Some aspects of microbiology applied to commercial apple juice production. V. Thermal death rates of spoilage organisms in apple juice. *Food Res.* 17, 204-211.
- MASSAGUER-ROIG, S.; RIZVI, S. S. H. y KOSIKOWSKI, F. V. 1984. Characterization of thixotropic behaviour of soft cheeses. *J. Food Sci.* 49, 668-670, 684.
- McFADDIN, J.F. 1985. Media for Isolation - Cultivation - Identification - Maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- McILVAINE, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183-187.
- McLEAN, J. y HENDERSON, A. 1966 Test for the presence of nitrite not involving carcinogenic reagents. *J. Clin. Path.* 19, 632-643.
- McMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; ROOS, T. y RATKOWSKY, D.A. 1993. Predictive microbiology: Theory and application. Research Studies Press, Tauton, UK.
- MENEGAZZI, G. S. y INGLEDEW, W.M. 1980. Heat processing of spent brewer's yeast. *J. Food Sci.* 45, 182-186, 196.
- MEYER, R. S.; GRANT, M. A.; LUEDECKE, L. O. y KEUNG, H. K. 1989. Effects of pH and water activity on microbiological stability of salad dressing. *J. Food Prot.* 52, 477-479.
- MIZRAHI, S. y BERK, Z. 1972. Flow behaviour of concentrated orange juice: mathematical treatment. *J. Texture Stud.* 3, 69-79.
- MONTVILLE, T. J. y SAPERS, G. M. 1981. Thermal resistance of spores from pH elevating strains of *Bacillus licheniformis*. *J. Food Sci.* 46, 1710-1712.
- MORESI, S. y SPINOSI, M. 1984. Engineering factors in the production of concentrated fruit juices. II. Fluid physical properties of grape juices. *J. Food Technol.* 19, 519-533.
- MULLER, G. 1981. Microbiología de los alimentos vegetales. Editorial Acribia. Zaragoza.
- MULLER, H. G. 1973. An introduction to food rheology. William Heinemann Ltd. (Ed.). Londres.
- NAFISI, K. y MARKAKIS, P. 1983. Inhibition of sugar-amine browning by aspartic and glutamic acids. *J. Agr. Food Chem.* 31, 1115-1123.
- NAGY, S.; LEE, H.; ROUSEFF, R. L. y LIN, J. C. C. 1990. Noenzymatic browning of commercially canned and bottled grapefruit juice. *J. Agric. Food Chem.* 38, 343-346.

- NAMIKI, M y HAYASHI, T. A. 1982. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. En "Maillard reaction in foods and nutrition". Waller, G. R. y Feather M. S. (Eds.). American Chemical Society. Washington D. C.
- NUÑEZ, J. M. y LAENCINA, J. 1990. Reacción de Maillard en alimentos. *Alimentación equipos y tecnología*. Abril, 103-109.
- NURSTEN, H. E. 1981. Recent developments in studies of the Maillard reaction. *Food Chem.* 6, 263-277.
- O'BEIRNE, D. 1986. Effects of pH on non-enzymic browning during storage in apple juice concentrate prepared from Bramley's Seedling Apples. *J. Food Sci.* 51, 1073-1074.
- ODIGBOH, E. V. y MOHSENIN, N. N. 1975a. Effects of concentration on the flow rheology of butter and margarine. *J. Texture Stud.*, 6, 533-539.
- ODIGBOH, E. V. y MOHSENIN, N. N. 1975b. Effects of concentration on the viscosity profile of cassava starch pastes during the cooking-cooling process. *J. Texture Stud.*, 5 441-457.
- OLSON, J. C. y NOTTINGHAM, P. M. 1983. Temperatura. En "Ecología microbiana de los alimentos. Vol. I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos". I.C.M.S.F. (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Editorial Acribia. Zaragoza.
- PAREDES, M. D. C.; RAO, M. A. y BOURNE, M. C. 1988. Rheological characterization of salad dressing. 1. Steady shear, thixotropy and effect of temperature. *J. Texture Stud.* 19, 247-258.
- PARISH, M. E. y HIGGINS, D. P. 1989. Yeasts and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. *J. Food Prot.* 52, 261-263.
- PARISH, M. E. y HIGGINS, D. P. 1990. Investigation of the microbial ecology of commercial grapefruit sections. *J. Food Prot.* 53, 685-688.
- PARK, H. S. y MARTH, E. H. 1972. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. *J. Milk Food Technol.* 35, 532-539.
- PARRY, J. M.; DAVIES, J. E. y EVANS, W. E. 1976. Effects of "cell age" upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Gen. Genetics.* 146, 27-38.
- PEDERSON, C. S.; ALBURY, M. N. y CHRISTENSEN, M. D. 1961. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperature. *Appl. Microbiol.* 9, 162-167.
- PERRY, R. H. y CHILTON, C. H. 1982. Manual del ingeniero químico. 2ª Edición. McGraw-Hill. México
- PETRIELLA, C.; RESNIK, S. L.; LOZANO R. D. y CHIRIFE, J. 1985. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to non enzymatic browning. *J. Food Sci.* 50, 622-626.
- PEYNAUD, E. y DOMERCQ, S. 1964. *Candida vanriji*, dans des jus de raisin conservés à basse température. *Arch. Mikrobiol.* 47, 219-224.
- PHARMACOPÉE FRANCAISE. 1986. Controle de la contamination microbienne dans les produits non obligatoirement stériles. Solution et milieux de culture recommandés. VII.10.
- PITT, J.I. 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, Inc., London. England.
- POWRIE, W. D. y TUNG, M. A. 1976. Principles of food science. Part I Food Chemistry. Fennema (Ed.). O.R.N.Y. New York. U.S.A.
- PRENTICE, J. H. 1984. Measurements in the rheology of foodstuffs. Elsevier Applied Science Publishers. Ltd. Barking. England.

- PRICE-JONES, J. 1953. The rheology of honey. In "Foodstuffs, their plasticity, fluidity and consistency. Scott-Blair, G.W. Ed. Amsterdam. Holly.
- PRIMO, E. 1979. Química agrícola: Alimentos. Tomo III. Editorial Alhambra. Madrid.
- PRINCIPE, L. y LOZANO, J. E. 1991. Reduction and control of non-enzymic browning in clarified apple juice by absorption and ion exchange. *Lebensm. Wiss. Technol.* 24, 34-38.
- PUT, H. M. C. y DE JONG, J. 1980. The heat resistance of selected yeasts causing spoilage of canned soft drinks and fruit products. En "Biology and activities of yeasts. SAB. Symposium series. Skinner, F. A.; Davenport, R. P. y Passmore, S. S. (Eds.). Academic Press. London.
- PUT, H. M. C. y DE JONG, J. 1982. The heat resistance of ascospores of four *Saccharomyces* spp. isolated from spoiled heat processed soft drinks and fruit products. *J. Appl. Bacteriol.* 52, 235-242.
- PUT, H. M. C.; De JONG, J.; SAND, F. E. M. J. y VAN GRISNVEN, A. M. 1976. Heat resistance studies on yeasts spp. causing spoilage in soft drinks. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 135-152.
- RAO, M. A. 1975. Measurements of flow properties of food suspensions with a mixer. *J. Texture Stud.* 6, 533-539.
- RAO, M. A. 1977a. Rheology of liquid foods. A review. *J. Texture Stud.* 8, 135-168.
- RAO, M. A. 1977b. Measurement of flow properties of fluid foods. Developments, limitations, and interpretation of phenomena. *J. Texture Stud.* 8, 257-282.
- RAO, M. A. 1986. Rheological properties of fluid food. En "Engineering properties of foods". Rao, M. A. Y Rizvi, S. S. H. Eds. Marcel Dekker. New York.
- RAO, M. A., BOURNE, M. C. y COOLEY, H. J. 1981. Flow properties of tomato concentrates. *J. Texture Stud.* 12, 521-528.
- RAO, M. A.; COOLEY, H. J.; NOGEIRA, S. N. y McLELLAN, M. R. 1986. Rheology of apple sauce: Effect of apple cultivar, firmness and processing parameters. *J. Food Sci.* 51, 176-178.
- RAO, M. A.; COOLEY, H.J. y VITALI, A.A. 1984. Flow properties of concentrated juices at low temperatures. *Food Technol.* 38, 113-119.
- RAO, M. A.; PALOMINO, L. M. y BERNHARDT, L. N. 1974. Flow properties of tropical fruit purees. *J. Food Sci.* 39, 160-161.
- RAO, V. N. M.; HAMANN, D. D. y HUMPHRIES, E. G. 1975a. Apparent viscosity as a measure of moist mouthfeel of sweet potatoes. *J. Food Sci.*, 40, 97-100.
- RAO, V. N. M.; HAMANN, D. D. y HUMPHRIES, E. G. 1975b. Flow behaviour of sweet potato puree and its relation to mouthfeel quality. *J. Texture Stud.*, 6, 197-209.
- RAPER, K.B. y FENNELL, D.I. 1965. The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore, USA
- RAPER, K.B. y THOM, C. 1949. A manual of the *Penicillia*. Williams and Wilkins. Baltimore, USA
- REID, D. S. 1992. Water relations of foods, a key to product stability. En "Advances in food engineering." Singh, R. P. y Wirakartakusumah, M. A. (Eds.). CRC Press. Boca Raton. Florida.
- REMACHA, J. E.; IBARZ, A. y GINER, J. 1992. Evolución del color por efecto de la temperatura en pulpas de fruta. *Alimentaria.* 234, 59-68.
- RESNIK, S. y CHIRIFE, J. 1979. Effect of moisture content and temperature on some aspect of nonenzymatic browning in dehydrated apple. *J. Food Sci.* 44, 601-605.
- RHA C. K. 1978. Rheology of fluid foods. *Food Technol.* July, 77-82.
- RHA, C. H. 1975. Theory, determination and control of physical properties of food materials.

- D. Reidel Publ. Co., U.S.A.
- ROBERTS, T. A. y HITCHINS, A. D. 1969. Resistance of spores. En "The bacterial spore." Gould, G. W. y Hurst, A. (Eds). Academic Press. New York.
- ROCKLAND, L. B. y NISHI, S. K. 1980. Influence of water activity on food product quality and stability. *Food Technol.* 42, 44-46, 48-51, 59.
- RODRIGO, M.; MARTINEZ, A.; SANCHIS, J.; TRAMA, J. y GINER, V. 1990. Determination of hot-fill-cool process specifications for crushed tomatoes. *J. Food Sci.* 55, 1029-1032.
- RUSSEL, A. D. 1971. The destruction of bacterial spores. En: "Inhibition and destruction of the microbial cell". Hugo, W. D. (Ed.). Academic Press. New York.
- SÁENZ, C. y COSTELL, E. 1986. Comportamiento reológico de productos de limón. Influencia de la temperatura y de la concentración. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 26, 581-588.
- SAGUY, J., KOPELMAN, I. J. y MIZRAHI, S. 1978. Extent of nonenzymatic browning in grapefruit juice during thermal and concentration processes: kinetics and prediction. *J. Food Proc. Preserv.*, 2, 175-184.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. y FILTENBORG, O. 1995. Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Baarn. The Netherlands.
- SAND, F. E. M. J. 1969. An ecological survey of yeasts within a soft drinks plant. Proc. Int. Symp. Yeasts. 4th. Hochsch. Bondenkult. Viena. p. 263.
- SAND, F. E. M. J. 1973. Recent investigation on the microbiology of fruit juice concentrates. En "Scientific-Technical Commission XIII. Technology of Fruit Juice Concentrates-Chemical Composition of Fruit Juices". Int. Fed. Fruit Juice Processors, Vienna.
- SAND, F. E. M. J. y GRINSVEN. 1976. Investigation of yeasts strains isolated from scandinavian soft drinks. *Brauwissenschaft.* 19, 353-355.
- SAPERS, G. M. y DOUGLAS, F. W. 1987. Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in the juice of raw apple and pear fruits. *J. Food Sci.* 52, 1258-1263.
- SARAVACOS, G. D. 1968. Tube viscometry of fruit juices and purees. *J. Food Sci.* 22, 1585-1588.
- SARAVACOS, G. D. 1970. Effect of temperature on viscosity of fruit juices and purees. *J. Food Sci.* 35, 122-125.
- SARAVACOS, G. D. 1995. Transport properties in processing of fruit and vegetables. *Food Technol.* 49, 99-105.
- SCALZO, A.M.; DICKERSON Jr., R.W.; PEELER, J.T. y READ Jr., R.B. 1970. The viscosity of egg and egg products. *Food Technol.* 24, 1301-1307.
- SCHMIDT, C. F. 1957. Thermal resistance of microorganisms. En "Antiseptics, disinfectants, fungicides and sterilization. Reddish, G. F. (Ed.). Lea and Febiger. Philadelphia. Pennsylvania.
- SCHRAMM, G. 1984. Introducción a la viscosimetría práctica. Gebruder HAAKE. Dieselstrasse. Germany.
- SCHWARTZ, M. y COSTELL, E. 1989. Influencia de la temperatura y de la concentración en la viscosidad de los zumos de manzana y de uva. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 2, 239-245.
- SCOTT-BLAIR, G.W. 1958. Rheology in food research. En "Advances in food research. Vol. III." Mraz, M. E. y Stewart, G. F. Eds. Academic Press. New York.
- SCOTT-BLAIR, G.W. 1966. The success of the Casson's equation. *Rheol. Acta.* 5, 184-187.
- SHALLENBERGER, R. S. y MATTICK, L. R. 1983. Relative stability of glucose and fructose at different acid pH. *Food Chem.* 12, 159-165

- SHAMA, F. y SHERMAN, P. 1973. Identification of stimuli controlling the sensory evaluation of viscosity. II. Oral methods. *J. Texture Stud.*, 4, 111-118.
- SHERMAN, J. M.; STARK, C. N. y STARK, P. 1929. An unappreciated but important factor in pasteurization milk. *J. Dairy Sci.* 12, 385-393.
- SHERMAN, P. 1970. Industrial rheology. Academic Press. New York.
- SHIBASAKI, I. y TSUCHIDO, T. 1973. Enhancing effect of chemicals on thermal injury of microorganisms. *Acta Alim.* 2, 327-349.
- SINGH, R. K.; LUND, D.B. y BUELOW. 1983. Storage stability of intermediate moisture apples: kinetics of quality change. *J. Food Sci.* 48, 939- 944.
- SKINNER, G. E. y LARKIN, J. W. 1994. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *J. Food Safety.* 14, 175-217.
- SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. and HOLT, J. G.(Eds.). 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- SNEATH, P.H.A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. En "Bergey's manual of systematic bacteriology". Vol. 2. SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. y HOLT, J. G. (Eds.). Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- SPEERS, R. A.; TUNG, M. A. y JACKMAN, R. L. 1987. Prediction of colour deterioration in strawberry juice. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 20, 15-18.
- SPLITTSTOESSER, D. F.; LIENK, L. L.; WILKISON, M. y STAMER, J. R. 1975. Influence of wine composition on the heat resistance of potential spoilage microorganisms. *Appl. Microbiol.* 30, 369-373.
- STAMP, J. A. y LABUZA, T. P. 1983. Kinetics of the Maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperatures. *J. Food Sci.* 48, 543-544.
- STANNARD, C. J.; WILLIAMS, A. P y GIBBS, P. A. 1985. Temperature/ growth relationship for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiol.* 2, 115-122.
- STECCHINI, M. y BEUCHAT, L. R. 1985. Effects of sugars in growth media, diluents and enumeration media on survival and recovery of *Saccharomyces cerevisiae* heated in peach puree. *Food Microbiol.* 2, 85-95.
- STEEL, R. G. y TORRIE, J. H. 1960. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Company, New York.
- STEFFE, J. F. y FORD, E. W. 1985. Rheological techniques to evaluate the self-stability of starch thickened strained apricots. *J. Texture Stud.* 16, 179-192.
- STEFFE, J.F.; MOHAMED, I.O. y FORD, E.W. 1986. Rheological properties of fluid food. Data compilation. En "Physical and chemical properties of food". Okos, M.R. Ed. ASAE publication.
- STUMBO, C. R. 1973. Thermobacteriology in food processing. Academic Press. New York.
- TANGLERTPAIBUL, T. y RAO, M.A. 1987. Rheological properties of tomato concentrates as affected by particle size and methods of concentration. *J. Food Sci.* 52, 141-145.
- TANNENBAUM, S. R. 1982. Modificaciones químicas y biológicas de los alimentos y su influencia sobre la calidad. En "Introducción a la ciencia de los alimentos". Fennema, O. R.(Ed.). Editorial Reverté. Barcelona.
- THEOPHILUS, D. R. y HAMMER, B. W. 1938. Influence of growth temperature on the thermal resistance of some bacteria from evaporated milk. *Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* N° 244.
- TIU, C. y BOGER, D.V. 1974. Complete rheological characterization of time-dependent food products. *J. Texture Stud.* 5, 329-338.
- TOMLINS, R. I. y ORDAL, Z. J. 1976. Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria. En "Inhibition and inactivation of vegetative microbes. Skinner, F. A. y Hugo, W. B. (Eds.). *Society of Applied Bacteriology Symposia Series.* N° 5, 135-190.

- Academic Press. New York.
- TORIBIO, J. L. y LOZANO, J. E. 1984. Nonenzymatic browning in apple juice concentrate during storage. *J. Food Sci.* 49, 889-892
- TORIBIO, J. L. y LOZANO, J. E. 1986. Heat induced browning of clarified apple juice at high temperatures. *J. Food Sci.* 51, 172-179.
- TORIBIO, J. L. y LOZANO, J. E. 1987. Formation of 5-hydroxymethylfurfural in clarified apple juice during heating at elevated temperatures. *Lebensm. Wiss. Technol.* 20, 59-64
- TORIBIO, J. L.; NUNES, R. V. y LOZANO, J. E. 1984. Influence of water activity on the nonenzymatic browning of apple juice concentrate during storage. *J. Food Sci.* 49, 1630-1631.
- TOROK, T. y KING, A. D. 1991a. Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1207-1212.
- TOROK, T. y KING, A. D. 1991b. Thermal inactivation kinetics of food-borne yeasts. *J. Food Sci.* 56, 6-9, 59.
- TRIFIRO, A., GHERARD, S. y CALZA, M. 1995. Effects of storage time and temperature on the quality of fresh juices from pigmented oranges. *Industria conserve*, 70, 243-251.
- TSANG, E. W. T. y INGLEDEW, W. M. 1982. Studies on the heat resistance of wild yeasts and bacteria in beer. *J. Am. Soc. Brewing.* 40, 1-8.
- TUNG, M.A.; RICHARDS, J.F.; MORRISON, B.S. y WATSON, E.L. 1970. Rheology of fresh, aged and gamma-irradiated egg white. *J. Food Sci.* 35, 872-874.
- TURTURA, G. C. y MASSA, S. 1987. Microbiological research on soft drinks. VIII. A case of alteration of fruit juices packaged in flexible multilayer containers. *Microbiol. Alim. Nutr.* 5, 17-20.
- TURTURA, G. C. y SAMAJA, T. 1978. Recherche microbiologiche sulle bevande analcolique. II. Influenza degli aromatizzanti naturali. *Ann. Microbiol.* 28, 15-23.
- TURTURA, G. C.; MASSA, S. y CICCARONE, C. 1988. Microbiological researchs on soft drinks. IX. A study of fruit juices in soft-pack, multilayer containers. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* 6, 201-208.
- VAUGHN, R. H. MURDOCK, D. Y. y BROKAW, C. H. 1957. Microorganisms of significance in frozen citrus product. *Food Technol.* 7, 92-95.
- VENTURA, F; GUERRERO, L., SERRA, J y BOTA, E. 1990. Influencia de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del zumo de naranja envasado en tetra-brik. *Alimentación, equipos y tecnología*, Diciembre, 95-98.
- VICINI, E.; BARBUTI, S.; SPOTTI, E.; CAMPANINI, M.; CASTELVETRI, F.; GOLA, S.; MANGANELLI, E.; CASSARA, E. y CASOLARI, A. 1984. Alterazione di succhi di frutta causata da muffe gasogene. *Ind. Conserve.* 59, 4-7.
- VILLOTA, R. y HAWKES, J. G. 1992. Reaction kinetics in food systems. En "Handbook of food engineering." Heldman, D R. y Lund, D. B. (Eds.). Marcel Dekker. New York.
- VITALI, A. A. y RAO, M. A. 1982. Flow behaviour of guava puree as a function of temperature and concentration. *J. Texture Stud.* 13, 275-289.
- VITALI, A. A. y RAO, M. A. 1984. Flow properties of low-pulp concentrated orange juice: effect of temperature and concentration. *J. Food Sci.* 49, 882-888.
- VITALI, A. A.; ROIG, S. M. y RAO, M. A. 1974. Viscosity behaviour of concentrated passion fruit. *Confructa.* 19, 201-206.
- von SCHELHORN, M. 1951. Control of microorganisms causing spoilage in fruit and vegetable products. *Adv. Food Res.* 3, 429-482.
- WALKER, H. W. y AYRES, J. C. 1970. Yeasts as spoilage organisms. En "The yeasts. Vol.

- 3". Rose, A. H. y Harrison, J. S. (Eds.). Academic Press. Londres.
- WALT, J. P. van der, y YARROW, D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. En "The yeasts, a taxonomic study". KREGER- van RIJ, N. J. W. (Ed.). Elsevier. Amsterdam.
- WALTERS, K. 1975. Rheometry. Chapman and Hall. London.
- WARMBIER, H. C.; SCHNICKELS, R. A. y LABUZA, T. P. 1976. Effect of glycerol on non enzymatic browning in a solid intermediate moisture food system. *J. Food Sci.* 41, 521-531.
- WAZER van, J.R.; LYONS, J.W.; KIM, K.Y. y COLWELL, R.D. 1963. Viscosity and flow measurements. A laboratory hybook of rheology. Interscience Publ., New York. U.S.A.
- WEBB, T. A. y MUNDT, J. O. 1978. Molds on vegetables at the time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 655-658.
- WELTMANN, R.N. 1943. Breakdown of tixotropic structure as function of time. *Appl. Phys.* 14, 343-350.
- WHITE, G. W. 1970. Rheology in food research. *J. Food Technol.* 5, 1-32.
- WHITING, R. C. y BUCHANAN, R. L. 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol.* 10, 175-177.
- WHITING, R. C. y BUCHANAN, R. L. 1994. Microbial modeling. *Food Technol.* 48, 113-120.
- WICKERHAM, L.J. 1951. Taxonomy of yeasts. *Techn. Bull.* 1029, U.S. Department Agriculture. Washington.
- WILSON, R. A. 1975. A review of thermally produced imitation meat flavors, *J. Agric. Food Chem.* 5, 1032-1037.
- WOLFROM, M. L. 1952. Contributions of browning research to ration item stability. Research and Development Associates. Food and Container Institute Inc. Chicago, Illinois.
- WONG, M y STANTON, D. W. 1989. Nonenzymic browning in kiwifruit juice concentrate systems during storage. *J. Food Sci.* 54, 669-673.
- WONG, M y STANTON, D. W. 1992. Effect of removal of amino acids and phenolic compounds on non-enzymic browning in stored kiwifruit juice concentrates. *Lebensm. Wiss. Technol.* 26, 138-144.
- WOOD, F.W. 1968. Psychophysical studies on the consistency of liquid foods. En "Rheology and texture of foodstuffs. SCI Monograph No. 27. The Society of Chemical Industry. London. Engly.
- XU, S.J.; LEWIS, J.I y SHOEMAKER, C.F. 1984. A computerized system for the adquisition and analysis of time dependent flow data. *J. Texture Stud.* 15, 407-414.
- ZEMEL, G. P.; SIMS, C.A.; MARSHALL, M. R. y BALABAN, M. 1990. Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. *J. Food Sci.* 55, 562-563.