

CAPITULO II

Evaluación antimicrobiana del sorbato de potasio a diferentes pH, a_w y tipo de soluto.

1.1 INTRODUCCION

El ácido sórbico es un ácido graso de cadena lineal trans-trans insaturada de ácido graso (ácido 2,4 –hexadienoico) con un peso molecular de 112.13 g/mol. El grupo carboxílico del ácido sórbico es altamente reactivo y puede formar varias sales y ésteres. Una de las sales más comunes es el sorbato de potasio, la cuál se puede presentar en forma de gránulos o polvos, teniendo una potencia antimicrobiana del 74%; así mismo, presenta una alta solubilidad en medio acuoso y muchas aplicaciones en alimentos (Sofos y Busta, 1993).

Las soluciones acuosas son relativamente inestables y se degradan por reacciones cinéticas de primer orden. Los agentes oxidantes atacan los sorbatos en los enlaces oleofínicos y derivan en la formación de peróxidos, seguidos de su degradación y polimerización. El sorbato de potasio puede ser polimerizado durante el almacenamiento y adquirir un color amarillo (Sofos, 1989).

La difusión del sorbato de potasio en los alimentos es influida por las propiedades del sustrato tales como composición, estado físico, estructura, humedad y actividad de agua (Sofos y Busta, 1993).

Los estudios han reportado que los sorbatos retardan el crecimiento de numerosos microorganismos, incluyendo levaduras, mohos, bacterias deteriorativas y patógenas. De igual manera inhiben un gran número de bacterias (Tabla 2.1) tales como gram positivas, gram negativas, catalasa positiva, catalasa negativa, aerobios y anaerobios, mesofílicos y psicotróficos (Sofos, 1989).

Tabla 2.1 Bacterias inhibidas por la acción del sorbato

| | |
|--------------------------------------|--|
| <i>Acetobacter aceti</i> | <i>L. brevis</i> |
| <i>A. Xylinum</i> | <i>L. bulgaricus</i> |
| <i>Achromobacter</i> spp. | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| <i>Acinetobacter</i> spp. | <i>Micrococcus</i> spp. |
| <i>Aerobacter aerogenes</i> | <i>Moraxella</i> spp. |
| <i>Aeromonas</i> spp. | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | <i>Pediococcus cerevisiae</i> |
| <i>Alteromonas putrefaciens</i> | <i>Propionibacterium freundenreichii</i> |
| <i>Arthrobacter</i> spp. | <i>P. zeae</i> |
| <i>A. agilis</i> | <i>Proteus morganii</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | <i>P. vulgarices</i> |
| <i>B. coagulans</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>B. polymyxa</i> | <i>P. fluorescens</i> |
| <i>B. stearothermophilus</i> | <i>P. fragi</i> |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Clostridium botulinum</i> | <i>S. heidelberg</i> |
| <i>C. butyricum</i> | <i>S. montevideo</i> |
| <i>C. perfringens</i> | <i>S. typhimurium</i> |
| <i>C. sporogenes</i> | <i>Sarcina lutea</i> |
| <i>C. toanum</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>E. freundii</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| <i>Flavobacterium-cytophaga</i> spp. | <i>S. lactis</i> |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>S. thermophilus</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Vibrio. parahaemolyticus</i> |
| <i>L. arabinosus</i> | |

Sofos (1989)

1.1.1 Factores que determinan la actividad antimicrobiana de los sorbatos.

a. Composición del alimento

La inactivación o inhibición microbiana es más eficiente en sustratos simples que en sistemas complejos. En emulsiones grasa en agua como la mayonesa, margarina y aderezos, el nivel de sorbato necesario es relativamente alto comparado con otros conservadores de alimentos. Sal, azúcar y otros componentes solubles reducen la concentración de sorbato en la fase acuosa (Sofos, 1989).

b. Flora microbiana

El tipo y número de microorganismos presentes en un producto alimenticio pueden afectar el potencial de sorbato para inhibir el crecimiento y preservar el producto. Algunos microorganismos pueden crecer en presencia de altas concentraciones de sorbato (>0.3%), mientras que otras son inhibidas con concentraciones muy bajas (<0.05%). En alimentos contaminados con una flora mixta de microorganismos, algunos de éstos pueden ser inhibidos mientras que la resistencia de otros permite que crezcan y contaminen el alimento. La acción antimicrobiana del sorbato de potasio es reducida al aumentar los niveles de contaminación (Sofos, 1989).

c. actividad de agua

La acción de los antimicrobianos en alimentos se ve generalmente incrementada conforme la actividad de agua (a_w) del sistema es reducida. Algunos estudios han reportado un incremento en la actividad antimicrobiana del sorbato cuando se adiciona azúcar o cloruro de sodio al sustrato. En general se cree que los solutos incrementan la actividad inhibitoria del sorbato por la reducción de la a_w . Un modo potencial de acción para este fenómeno puede ser que los solutos inducen el

hinchamiento celular, el cuál incrementa la sensibilidad de los microorganismos a los conservadores (Liewen y Marth, 1985).

d. pH

La acción antimicrobiana se incrementa cuando el pH disminuye y se aproxima a la constante de disociación (pKa) del componente; de tal manera, que el sorbato de potasio es más efectivo como conservador de productos alimenticios cuando los valores de pH son bajos (<6.5) ya que el valor de pKa es de 4.8. El sorbato de potasio es inefectivo a valores de pH 7 y arriba de éste (Sofos, 1989).

El incremento de la actividad inhibitoria del sorbato a bajos valores de pH es atribuido a la influencia del pH en la no disociación del ácido presente en el sustrato; de tal manera que la mayor actividad antimicrobiana se encuentra en la forma no disociada. En adición al pH, la disociación del sorbato está influenciado por la solubilidad y actividad de agua del sistema (Sofos, 1989).

1.1.2 Modo de acción del sorbato de potasio

El mecanismo y modo de acción del sorbato de potasio, está en función de condiciones específicas como el tipo y especie de microorganismo, tipo y propiedades del sustrato, condiciones del medio y otros parámetros de proceso o ingredientes (Sofos, 1989).

Los mecanismos de inhibición por acción del sorbato en el crecimiento microbiano incluyen alteraciones en la morfología, integridad, y función de la membrana celular, así como inhibición de funciones de transporte y actividad metabólica (Sofos, 1989); la muerte de microorganismos expuestos a altas concentraciones de sorbato es atribuida a la generación de agujeros en la membrana celular. El sorbato disminuye la asimilación de carbono de algunos sustratos tales como glucosa, acetato, succinato, piruvato, lactato, oxaloacetato, α -ketoglutarato, etanol,

y acetaldehído. La inhibición del metabolismo celular por el sorbato se debe a la inhibición de enzimas, a la toma de nutrientes o a varios sistemas de transporte (Sofos y Busta, 1993).

El sorbato inhibe la actividad de algunos sistemas enzimáticos, los cuales pueden llevar al rompimiento de procesos vitales involucrados en funciones de transporte, metabolismo celular, crecimiento y replicación. Las enzimas inhibidas por el sorbato incluyen alcohol dehidrogenasa, fumarasa, enolasa, aspartasa, catalasa, malato dehidrogenasa, entre otras. Así mismo, el sorbato puede interferir con algunos sustratos y con el mecanismo de transporte de electrones (Sofos, 1993). Los iones hidrógenos se encuentran fuera de la célula provocando un pH ácido, mientras que los iones hidroxilo se encuentran dentro de la misma ocasionando que la célula presente un pH próximo a la neutralidad. El gradiente de la membrana representa el potencial electroquímico utilizado en el transporte activo de algunos sustratos. Los ácido lipófilos débiles tratan de difundirse a través de la membrana, la molécula no dissociada se ioniza en el interior de la célula y se reduce el pH intracelular. Esto da como resultado un debilitamiento del gradiente de la membrana, de modo que el transporte de los sustratos resulta perjudicado (Jay, 1992).

1.1.3 Microbiología predictiva

La microbiología predictiva, es el modelado de poblaciones microbianas que une a la microbiología e ingeniería en alimentos, con matemáticas y estadísticas a fin de proveer descripciones y predicciones del comportamiento microbiano en sistemas alimenticios (Whiting y Buchanan, 1994). Su objetivo en alimentos, es la descripción matemática del crecimiento, inhibición o muerte bajo condiciones ambientales específicas de los microorganismos (McMeekin et al., 1993).

Una de las ventajas de los modelos predictivos, es que cuantifican los efectos de las interacciones entre dos o más factores ambientales involucrados (como a_w , soluto y pH), por lo que en muchos de los casos permiten interpolaciones para evaluar el comportamiento microbiano en situaciones no evaluadas.

Los modelos predictivos se clasifican primeramente en modelos que describen el crecimiento y modelos que describen la inactivación microbiana. Dentro de estas dos categorías se pueden clasificar en primarios, secundarios o terciarios. Los modelos de primer nivel describen los cambios en la respuesta microbiana en función del tiempo (por ejemplo: unidades formadoras de colonias por mililitro, formación de toxina, productos metabólicos, diámetro de colonias, absorbancia e impedancia). Los modelos de segundo nivel, describen la respuesta microbiana en términos de los parámetros de los modelos primarios y del efecto de los cambios en las condiciones ambientales (tales como pH, a_w , temperatura, presencia de agentes antimicrobianos). Los modelos terciarios, son rutinas de software para computadora que convierten a los modelos primarios y secundarios, en programas amigables para los usuarios (Alzamora, et al., 2002).

La experiencia obtenida en desarrollar modelos predictivos ha derivado en mejores diseños, eficiencia en la obtención de datos y precisión de resultados. Por lo tanto, la metodología de la microbiología predictiva provee un acercamiento sistemático a la planeación, recolección y procesamiento de datos de buena calidad, que describen los efectos de diferentes factores en combinación con el desarrollo microbiano. Los modelos secundarios tales como los diseños tipo superficie de respuesta, son un medio muy útil para visualizar efectos de distintos factores inhibidores así como sus interacciones (Alzamora, et al., 2002).

1.2 PLAN DE INVESTIGACION

A partir de los objetivos planteados se establece el siguiente plan de investigación:

1.2.1 Formulación de medios de cultivo

Formular medios sólidos (agares) nutritivos y no selectivos para el crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con diferentes niveles de a_w (0.99, 0.98, 0.97 y 0.96) utilizando como agentes depresores de la misma, sacarosa, cloruro de sodio y glicerol; con diferentes niveles de pH entre 4.5-3.5.

1.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento de *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, utilizando como agente antimicrobiano sorbato de potasio en cada uno de los medios formulados bajo diferentes condiciones de pH, a_w y agente depresor. La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se lleva a cabo mediante el software Spiral Gradient Endpoint (Spiral Biotech, Inc.).

1.2.3 Predicción del comportamiento de los microorganismos estudiados a partir del modelo generado.

Apartir del modelo generado y dentro de los niveles de las variables estudiadas (pH, a_w y tipo de soluto), se predice el comportamiento de los microorganismos estudiados.

1.3 MATERIALES Y METODOS

1.3.1 Microorganismos

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria innocua* ATCC 51742, *Salmonella thyphimurium* ATCC 35218, obtenidas del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla, las cuales se hicieron crecer en cuñas de agar soya caseína (CASOY) (Merck, Merck México) a 35°C por 48 horas para después mantenerlas en refrigeración a 4°C y se resembraron continuamente (López-Malo, 1995).

1.3.2 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se tomó una asada de las cepas mantenidas en cuñas de agar CASOY y se hicieron crecer en caldo soya tripticaseína (CASOY) (Merck, Merck México) a las condiciones óptimas de temperatura (35°C). Los inóculos se resembraron cada 24 horas para mantener la fase exponencial de crecimiento.

1.3.3 Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon sistemas modelo sólidos utilizando como base agar soya tripticaseína (CASOY); a cada uno de ellos se les adicionó la cantidad requerida de soluto (cloruro de sodio, sacarosa o glicerol) para ajustar la actividad de agua a diferentes valores (0.99, 0.98, 0.97, 0.96). La cantidad de soluto adicionada se determinó utilizando las ecuaciones de Ross (1975) y Norrish (1980) (Apéndice A).

Los sistemas modelo con actividad de agua ajustada se esterilizaron a 121°C por 15 min. Una vez enfriados, se ajustó el pH a diferentes valores entre 4.5 y 3.5 adicionando ácido clorhídrico 0.1N (Merck CO, Darmstadt, Alemania) esterilizado por filtración en membrana de 0.45 micras (Micro Filtration Systems, Dublín, CA). Las cantidades necesarias de HCl para ajustar los sistemas se determinaron previamente mediante curvas de titulación.

Una vez solidificados los medios en cajas Petri de 15 cm, se adicionó 50 µl del antimicrobiano (sorbato de potasio al 5%) sobre la caja en forma exponencial mediante el sembrador en espiral (Autoplate 4000, Spiral Biotech, EUA) (Figura 2.3.1). Se dejó absorber en el agar el antimicrobiano durante dos horas y posteriormente se inocularon las bacterias (*Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) linealmente en forma radial en superficie mediante el uso de un hisopo, del centro a la orilla de la caja; basándose en la plantilla que se presenta en la figura 2.3.2.



Figura 2.3.1. Sembrador en espiral Autoplate 4000, Spiral Biotech, EUA.

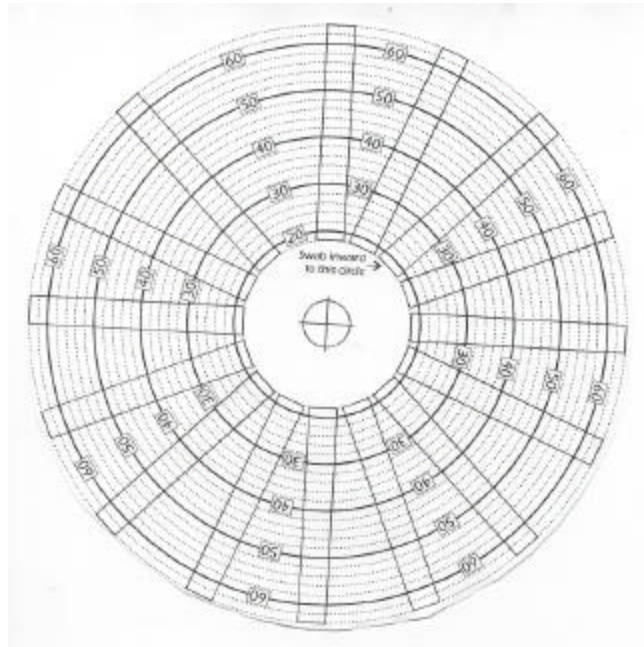


Figura 2.3.2 Plantilla en dónde las líneas concéntricas describen la ruta del antimicrobiano y cada línea radial es en dónde se deposita el inóculo.

El hisopo se humedecía en el caldo soya-tripticaseína que contenía a la bacteria cada vez que se inoculaba una línea. En una caja Petri se inoculaban las 4 bacterias (*Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) por triplicado, de tal manera que la caja quedaba sembrada como se observa en la figura 2.3.3. Cada color representa una bacteria diferente.

Una vez inoculadas las cajas, se incubaron a 35°C por 48 horas; al término de este tiempo se midió el crecimiento de las bacterias según la plantilla mostrada en la figura 2.3.1. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada agente antimicrobiano mediante el software Spiral Gradient Endpoint (Spiral Biotech, Inc.).

Debido a que el antimicrobiano se encuentra depositado en forma de espiral en una concentración decreciente del centro hacia el extremo de la placa, el punto final de crecimiento se encuentra bien definido. Para predecir las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) el software utiliza la lectura ER (Endpoint Radius), que

corresponde a la disminución en el tamaño de la colonia y se le llama punto final radial.

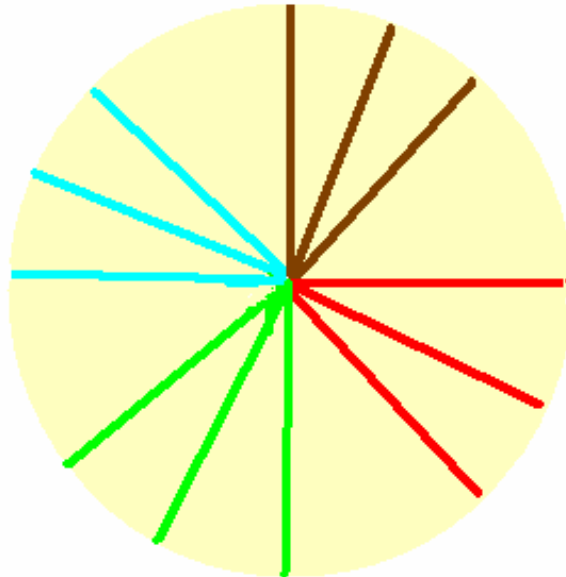


Figura 2.3.3. Esquema de una caja Petri de 15 cm inoculada con 4 bacterias diferentes.

1.3.4 Análisis estadístico

Después del periodo de incubación, se observaron las cajas y se registró si había o no crecimiento. En las condiciones donde se observó crecimiento se asignó el valor de “1” y en las que no hubo crecimiento el valor de “0”.

Las razones principales para seleccionar la regresión logística como la mejor opción de análisis de variables son (Hosmer y Lemeshow, 1989):

- 1) Desde el punto de vista matemático, es una función extremadamente flexible y fácil de utilizar.
- 2) Los resultados que se obtienen tienen significado y por lo tanto interpretación estadística y biológica.

El modelo de regresión logística, relaciona la probabilidad de que un evento ocurra en función de las variables condicionantes o independientes (x). La cantidad $\pi(x) = E(Y|x)$ representa la media condicional de Y dado x cuando se utiliza la distribución logística. El modelo específico de la regresión logística es el siguiente:

$$\pi(x) = \frac{\exp[\beta_0 + \beta_1 x_1]}{1 + \exp[\beta_0 + \beta_1 x_1]}$$

La transformación logística de $\pi(x)$ está definida de la siguiente forma:

$$\text{Logit}(p) = g(x) = \ln \left[\frac{\pi(x)}{1 - \pi(x)} \right] = \beta_0 + \beta_1 x_1$$

La importancia de esta transformación logit radica en que $g(x)$ tiene las mismas propiedades deseables que la regresión lineal. La transformación logit o $g(x)$ es lineal en sus parámetros, puede ser continua y puede variar dependiendo de la magnitud de x (Hosmer y Lemeshow, 1989).

En este trabajo las variables independientes fueron: pH, $1-a_w(A)$, concentración de sorbato de potasio (B) y tipo de soluto. La variable tipo de soluto es discreta y solo toma valores de "1, 0" (1) si es NaCl, "0,1" (2) si es sacarosa y "0,0" si es glicerol. Para ajustar el modelo de regresión logística a la respuesta de crecimiento de los microorganismos en estudio (*S. aureus*, *L. innocua*, *S. typhimurium*, *E. coli*), bajo las distintas combinaciones de variables evaluadas, se eligió un polinomio lineal que incluyera todas las interacciones posibles entre las variables independientes:

$$g(x) = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 \text{pH} + \beta_3 B + \beta_4 (1) + \beta_5 (2) + \beta_6 A \text{ pH} + \beta_7 A B + \beta_8 A (1) + \beta_9 A (2) + \beta_{10} \text{pH} B + \beta_{11} \text{pH} (1) + \beta_{12} \text{pH} (2) + \beta_{13} B (1) + \beta_{14} B (2).$$

dónde los coeficientes (β_i) son los parámetros a ser estimados aplicando el modelo de los datos experimentales.

Para el análisis estadístico se empleó el paquete SPSS 6.1 para Windows versión 10.0.5 (SPSS Inc., Chicago IL) para regresionar los datos obtenidos empleando la sub-rutina, "Logistic Regresión". Se calcularon además los valores de pruebas estadísticas de Chi-cuadrado y de Hosmer y Lemeshow (Lemeshow y Hosmer, 1982). Se evaluó la significancia de cada uno de los coeficientes del modelo y fueron eliminados del mismo si su probabilidad de ser cero era mayor de 0.10. Después de ajustar el modelo, se hicieron predicciones de la interface entre crecimiento y no crecimiento de cada uno de los microorganismos en estudio. Se calculó con el modelo obtenido la probabilidad de crecimiento de los microorganismos estudiados bajo las condiciones experimentales evaluadas.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSION

El pH y la actividad de agua del agar CASOY determinados al inicio y al final del periodo de incubación (48 horas), permanecieron constantes a lo largo del experimento aún con la adición del sorbato de potasio.

Las tablas 2.4.1 a la 2.4.4 muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas de los datos de las lecturas de crecimiento (NOTA: Estas tablas se anexan al final de este apartado); para lo cuál se utilizó la plantilla mostrada en la figura 2.3.2. Estas lecturas fueron introducidas en el software Spiral Gradient Endpoint (Spiral Biotech, Inc), para obtener las CMI. Cuando el microorganismo no es inhibido, la lectura de la plantilla es igual a 20, y cuando se inhibe completamente la lectura es igual a 64; cuando el microorganismo no es inhibido, el software calcula un concentración mayor o igual a la concentración máxima, la cuál es de 512 ppm al utilizar sorbato de potasio al 5%; así mismo, cuando el microorganismo es inhibido, la concentración es igual o menor a la concentración mínima correspondiente a la lectura, la cuál es de 4 ppm al utilizar sorbato de potasio al 5%.

En estas tablas se observa que el comportamiento de los microorganismos estudiados, es similar a los diferentes pH y actividades de agua, con excepción de *Escherichia coli* cuyo comportamiento es diferente, logrando su mayor inhibición cuando se utiliza NaCl como agente depresor. Con respecto a las demás bacterias, se observa que a valores altos de actividad de agua (0.99), el glicerol y el NaCl son mejores solutos para inhibirlas; sin embargo, a valores bajos (0.96), la sacarosa promueve la acción del sorbato de potasio inhibiendo a los microorganismos. Es importante mencionar que en términos generales, los resultados obtenidos en las cajas petri fueron de crecimiento o no crecimiento a los diferentes pH, a_w y solutos, más que encontrar concentraciones mínimas inhibitorias.

Los datos arrojados por el software Spiral Gradient Endpoint (Spiral Biotech, Inc), fueron utilizados en la regresión logística, en dónde el rango de pH se varió de 0.1 en 0.1 en el intervalo estudiado (de 4.5 a 3.5), y se asignó valores de “1” en aquellos sistemas en donde hubo crecimiento y valores de “0” en donde no se presento crecimiento; de esta regresión se obtuvo el modelo presentado en la tabla 2.4.5. Los coeficientes incluidos en el modelo son los que resultaron significativos ($p < 0.01$). El modelo permite calcular la probabilidad de crecimiento de las bacterias *S. aureus*, *L. innocua*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli.*, en medios formulados con distintos valores de a_w , pH, tipo de soluto y concentración de sorbato de potasio. En las figuras 2.4.1 a la 2.4.48 se muestran los efectos de las variables estudiadas sobre la probabilidad de crecimiento de cada uno de los microorganismos (NOTA: Para propósitos de continuidad del texto, estas figuras se anexan al final de este apartado).

Tabla 2.4.5. Estimados de los coeficientes del modelo logístico para predecir la probabilidad de crecimiento de las bacterias en estudio, inoculadas en diferentes formulaciones de agar CASOY.

| Variables | Intervalo | <i>S.aureus</i> | <i>L. innocua</i> | <i>S. typhimurium</i> | <i>E. coli</i> |
|-------------|-----------|-----------------|-------------------|-----------------------|----------------|
| 1-aw | 0.01-0.04 | 82.029 | 250.075 | 241.48 | 30.964 |
| pH | 4.6-3.5 | -24158.438 | -22712.866 | -21335.518 | -10663.844 |
| KS | 4-512 ppm | -0.0087613 | -0.0059564 | -0.008043918 | -0.0021596 |
| soluto | NaCl | 2.292 | 8.905 | 3.34 | 0.122 |
| | Sacarosa | 16.277 | 13.469 | 13.246 | 5.657 |
| 1-aw*pH | | 0 | 0 | 0.0 | 0 |
| 1-aw*KS | | 0.327 | 0.458 | 0.067306993 | 0.23029325 |
| 1-aw*soluto | | -118.252 | -321.041 | 6.6 | 5.818 |
| | | -515.884 | -550.964 | -524.3 | -167.561 |
| pH*KS | | -34.891 | -63.697 | -6.8 | -28.226 |
| pH*soluto | | -19962.224 | -16940.996 | -67095.6 | -20969.591 |
| | | -1946.203 | 3190.111 | -9715.148 | -8501.105 |
| KS*soluto | | -0.0007556 | -0.0052742 | 0.000597542 | -0.0050212 |
| | | -0.0060312 | -0.0059202 | 0.00495026 | -0.0045578 |
| cte | | 4.421 | -1.311 | 0.386 | 3.484 |

En todas las figuras se observa que la probabilidad de crecimiento de las bacterias en estudio, disminuye conforme aumenta la concentración de sorbato de potasio.

En las figuras 2.4.1 a la 2.4.12, se muestra el comportamiento de *S. aureus* a diferentes a_w , pH y tipo de soluto utilizado para disminuir la a_w . En ellas se observa, que a medida que disminuye la actividad de agua y por lo tanto aumenta la cantidad de NaCl en el medio, el microorganismo tiene mayor probabilidad de crecer; esto indica que a una a_w de 0.99 la probabilidad de crecimiento es menor que a una a_w de 0.96 en donde la concentración de cloruro de sodio es mayor; lo que demuestra que *S. aureus* es altamente tolerante a bajas actividades de agua (0.83) cuando se utiliza cloruro de sodio como agente depresor (Giannuzzi et al., 1998); sin embargo este mismo comportamiento se presenta si el soluto utilizado es glicerol. Así mismo, se observa que al emplear sacarosa como depresor de la actividad de agua, el comportamiento de *S. aureus* es diferente, ya que a menor actividad de agua (0.96) la probabilidad de crecimiento del microorganismo es reducida, y alcanza valores de 0.9 únicamente si el pH del medio es alto (alrededor de 4.6); Es importante señalar, que comparando la probabilidad de crecimiento de la bacteria a los diferentes valores de a_w estudiados, y con los diferentes tipos de soluto, la menor probabilidad de crecimiento se logra a una a_w de 0.96 utilizando sacarosa como agente depresor.

Como se puede observar, un humectante puede resultar más inhibitorio que otro, este fenómeno es conocido como “el efecto soluto”; Labuza et al. (1992), estudiaron el efecto de la a_w en el tiempo de generación de *Clostridium perfringens* a altas a_w y en medios conteniendo diferentes humectantes. Ellos observaron que un descenso en la a_w de 0.1 resultó en una velocidad de crecimiento diez veces menor para un sistema en el cuál la a_w estaba controlada por glicerol y siete veces menor para un sistema ajustado con sacarosa. Por lo que de acuerdo con esto, *Clostridium perfringens* resulta ser más inhibido cuando se usa glicerol como soluto que cuando se usa sacarosa o cloruro de sodio.

Troller (1987), señala que el soluto refleja la habilidad o inhabilidad de la membrana celular a excluir ciertos humectantes; por ello, los microorganismos

responden de manera diferente en la velocidad de crecimiento, dependiendo del tipo de soluto que se utilice para disminuir la actividad de agua.

En las figuras 2.4.13 a la 2.4.24 se muestra el comportamiento de *Listeria innocua*, cuando las variables estudiadas cambian. En estas figuras se observa que a medida que disminuye la actividad de agua, la probabilidad de crecimiento es mayor cuando se utiliza cloruro de sodio y glicerol como solutos; sin embargo a una misma a_w de 0.99 la probabilidad de crecimiento es menor cuando se usa glicerol como agente depresor que cuando se usa NaCl. De la misma manera, comparando ambos solutos a una a_w de 0.96, se observa que la probabilidad de crecimiento es mayor cuando se utiliza glicerol que cuando se utiliza NaCl. Al utilizar sacarosa como agente depresor, se observa que la mayor probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* se presenta cuando la a_w es alta (0.99), el pH del medio es alto (arriba de 4) sin importar la concentración de sorbato de potasio empleada, considerando que para este trabajo la concentración máxima estudiada fue 512 ppm; sin embargo, a medida que disminuye la a_w y aumenta la concentración de sacarosa en el medio, la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio cobra efectividad logrando disminuir la probabilidad de crecimiento de la bacteria en un 50% a un pH de 4.5 y 100 ppm de sorbato de potasio; por lo que se corrobora lo mencionado por Sofos (1989), que señala que la acción antimicrobiana del sorbato de potasio se incrementa cuando la actividad de agua disminuye por adición de azúcar o cloruro de sodio como sustratos.

Con lo que respecta al comportamiento de *Salmonella typhimurium*, se puede observar en las figuras 2.4.25 a la 2.4.36 que a actividades de agua de 0.99, el soluto que promueve la acción antimicrobiana del sorbato de potasio es cloruro de sodio y glicerol, siendo más efectivo el glicerol; sin embargo, a bajas actividades de agua (0.96), la acción antimicrobiana del sorbato se ve reducida con estos solutos, siendo inclusive inhibida cuando se utiliza glicerol como agente depresor. Al utilizar sacarosa, el comportamiento es diferente, a valores altos de a_w (0.99), la acción antimicrobiana del sorbato de potasio se ve inhibida, provocando una

alta probabilidad de crecimiento en un intervalo amplio de pH (4.6-3.7); sin embargo a medida que disminuye la actividad de agua la acción antimicrobiana del sorbato de potasio cobra efecto, provocando que a actividades de agua de 0.96, la probabilidad de crecimiento sea menor, inclusive a pH altos (4.2-4.6).

En referencia a *Escherichia coli*, las figuras 2.4.37 a la 2.4.48, muestran su comportamiento en los diferentes medios con las variables estudiadas. En estas figuras se puede observar, que al igual que los microorganismos anteriores, en medios con actividades de agua elevadas (0.99), el cloruro de sodio es un buen soluto para promover la acción antimicrobiana del sorbato de potasio cuando el pH es alto (4.5); de tal manera que a un pH de 4, con 150 ppm de sorbato de potasio se logra que la probabilidad de crecimiento disminuya un 50%. Cuando el soluto utilizado es sacarosa o glicerol, el comportamiento es diferente, ya que la acción antimicrobiana del sorbato de potasio se ve inhibida grandemente, provocando que con sacarosa a una a_w de 0.99 se requiera un pH de 3.7 y concentraciones de sorbato de potasio mayores a 200 ppm para inhibir a la bacteria. Inclusive si se utiliza glicerol como soluto, a medida que disminuye la actividad de agua, la probabilidad de crecimiento aumenta conforme disminuye el pH sin importar la concentración de sorbato de potasio que se utilice (recordando que en este trabajo la concentración máxima estudiada fue 512 ppm). Por lo que para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* usando como antimicrobiano sorbato de potasio en una concentración máxima de 512 ppm, únicamente es aconsejable utilizar NaCl como agente depresor de la actividad de agua.

En términos generales, la acción antimicrobiana del sorbato de potasio a valores de a_w altos (0.99), se ve favorecida cuando se utiliza glicerol y cloruro de sodio como agente depresor; mientras que para valores bajos de a_w (0.96), la acción antimicrobiana de sorbato de potasio, se ve favorecida al utilizar sacarosa como soluto.

Así mismo es importante mencionar que al utilizar glicerol y NaCl como agentes depresores, al disminuir la actividad de agua, la probabilidad de crecimiento de los microorganismos aumenta aunque disminuya el pH y la concentración de sorbato de potasio aumente hasta 512 ppm. De manera inversa sucede al utilizar sacarosa como soluto, ya que a medida que disminuye la actividad de agua, la probabilidad de crecimiento disminuye, y esta probabilidad disminuye aún más, si el valor de pH baja y la concentración de sorbato de potasio aumenta.

En cuanto a los microorganismos analizados, se observa un comportamiento similar ante las variables estudiadas, con excepción de *E. coli* que para lograr su inhibición es necesario utilizar cloruro de sodio como agente depresor, ya que la sacarosa y el glicerol inhiben la acción antimicrobiana del sorbato de potasio. Es por esto que es importante considerar el tipo de microorganismo en estudio, ya que de éste dependerá la velocidad y probabilidad de crecimiento bajo ciertas condiciones del medio.

En lo que respecta al pH, es importante mencionar, que a medida que éste disminuye, existen un mayor número de combinaciones de valores de a_w y concentración de sorbato de potasio, que aumentan las probabilidades de que el crecimiento de los microorganismos no ocurra; es decir, estas combinaciones disminuyen la probabilidad de crecimiento de los microorganismos.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, el tipo de soluto que se utilice para reducir la actividad de agua, es de suma importancia en la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio. Sofos (1989), señala que la actividad antimicrobiana del sorbato se incrementa con la adición de azúcar y cloruro de sodio en el medio; sin embargo la influencia de la reducción de agua por algún tipo de soluto no siempre es positiva; como por ejemplo, la presencia de azúcar o cloruro de sodio en ciertas situaciones, reduce el efecto sinérgico entre el sorbato de potasio y la temperatura sobre la inactivación de los microorganismos.

En general, se cree que los solutos incrementan la actividad inhibitoria del sorbato por reducción de la actividad de agua. El modo de acción se debe a que los solutos inducen que las células se hinchen, con lo cuál se incrementa la sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos (Sofos, 1989). Es importante mencionar, que al utilizar glicerol como agente depresor de la actividad de agua, se incrementa la velocidad de degradación del sorbato de potasio (Sofos, 1989), lo que provoca una disminución en su actividad antimicrobiana.

El incremento de la actividad inhibitoria del sorbato de potasio a bajos valores de pH es atribuido a la influencia del mismo en la no disociación del ácido en el sustrato; de tal manera que la forma no disociada presenta la mayor actividad antimicrobiana (Sofos, 1989). Pethybridge (1983), señala que la concentración de la forma no disociada del ácido se ve afectada cuando el valor de la constante de disociación (pKa) varía; y ésta puede verse afectada por la solubilidad del soluto y la actividad de agua del sistema (Sofos, 1989). Considerando un valor de pKa teórico de 4.8, se calculó el pka para cada tipo de soluto a las diferentes actividades de agua, para observar si el tipo de soluto afecta su valor. Para ello se utilizó la fórmula reportada por Pethybridge (1983) (Apéndice C). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.4.6.

Tabla 2.4.6 Valores de pKa para las diferentes a_w y los diferentes solutos.

| Aw | Sal | sacarosa | glicerol |
|------|------|----------|----------|
| 0.99 | 4.70 | 4.78 | 4.72 |
| 0.98 | 4.72 | 4.82 | 4.76 |
| 0.97 | 4.73 | 4.80 | 4.79 |
| 0.96 | 4.75 | 4.76 | 4.81 |

En la tabla anterior se observa, que los valores de pKa a las diferentes a_w y solutos no varían en más de 0.1 unidades, por lo que estos valores no son significativamente diferentes; sin embargo, para corroborar lo anterior, se calculó el porcentaje de la fracción no disociada del ácido a un pH constante (4.13) con el valor teórico de pKa (4.8) y con aquél que presentó la mayor diferencia (4.7);

obteniéndose valores de 79 y 73 por ciento respectivamente; lo que indica que la concentración de la fracción no disociada del ácido permanece casi constante, no afectando la eficacia de los agentes antimicrobianos; por lo que en este caso, los solutos no afectan de manera significativa la constante de disociación (pK_a) y la fracción no disociada del ácido. Es importante mencionar, que a medida que disminuye el valor de pH, la concentración no disociada del ácido aumenta, provocando un incremento en la actividad inhibitoria del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Como se puede observar en este trabajo, los modelos probabilísticos, permiten conocer o estimar el comportamiento de los microorganismos al combinar varios factores, lo cuál es de suma importancia; ya que este tipo de modelos permite identificar situaciones de mejora en la calidad de los productos y procesos, así como proveer beneficios en la seguridad alimentaria (Whiting, 1997). Así mismo, este trabajo corrobora lo que afirman los microbiólogos predictivos que el crecimiento o muerte de un microorganismo está definido por el ambiente que lo rodea. Este ambiente incluye tanto factores intrínsecos del alimento, como son la actividad de agua y el pH, y factores extrínsecos, tales como la temperatura y la composición de la atmósfera entre otros (Gibson et al., 1997).

Tabla 2.4.1. Concentraciones mínimas inhibitorias de sorbato de potasio al 5% para *Staphylococcus aureus*.

S. aureus

0.99

| pH | NaCl |
|------|------------|
| 4.58 | >= 512 ppm |
| 4.36 | >= 512 ppm |
| 4.13 | 256 ppm |
| 3.72 | 128 ppm |
| 3.56 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.52 | >= 512 ppm |
| 4.31 | >= 512 ppm |
| 4.13 | >= 512 ppm |
| 3.82 | >= 512 ppm |
| 3.53 | >= 512 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.6 | >= 512 ppm |
| 4.34 | >= 512 ppm |
| 4.12 | 256 ppm |
| 3.73 | 64 ppm |
| 3.64 | 64 ppm |

0.98

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.64 | >= 512 ppm |
| 4.43 | >= 512 ppm |
| 4.25 | 64 ppm |
| 3.99 | 16 ppm |
| 3.48 | >= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.49 | >= 512 ppm |
| 4.32 | >= 512 ppm |
| 4.07 | >= 512 ppm |
| 3.82 | >= 512 ppm |
| 3.58 | 128 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.61 | >= 512 ppm |
| 4.36 | >= 512 ppm |
| 4.06 | >= 512 ppm |
| 3.86 | 32 ppm |
| 3.57 | <= 4 ppm |

0.97

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.55 | >= 512 ppm |
| 4.07 | >= 512 ppm |
| 3.97 | >= 512 ppm |
| 3.76 | <= 4 ppm |
| 3.5 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.65 | >= 512 ppm |
| 4.19 | 128 ppm |
| 3.9 | 128 ppm |
| 3.59 | 64 ppm |
| 3.5 | 16 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.58 | >= 512 ppm |
| 4.45 | >= 512 ppm |
| 3.99 | >= 512 ppm |
| 3.74 | 64 ppm |
| 3.46 | 16 ppm |

0.96

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.55 | >= 512 ppm |
| 4.11 | >= 512 ppm |
| 3.84 | <= 4 ppm |
| 3.67 | <= 4 ppm |
| 3.46 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.54 | >= 512 ppm |
| 4.29 | >= 512 ppm |
| 3.93 | 128 ppm |
| 3.77 | <= 4 ppm |
| 3.61 | <= 4 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.51 | >= 512 ppm |
| 4.28 | >= 512 ppm |
| 4.09 | >= 512 ppm |
| 3.79 | >= 512 ppm |
| 3.56 | >= 512 ppm |

Tabla 2.4.2. Concentraciones mínimas inhibitorias de sorbato de potasio al 5% para *Listeria innocua*.

Listeria innocua

0.99

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.58 | >= 512 ppm |
| 4.36 | >= 512 ppm |
| 4.13 | 256 ppm |
| 3.72 | 128 ppm |
| 3.56 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.52 | >= 512 ppm |
| 4.31 | >= 512 ppm |
| 4.13 | >= 512 ppm |
| 3.82 | 128 ppm |
| 3.53 | 128 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.6 | >= 512 ppm |
| 4.34 | 16 ppm |
| 4.12 | 8 ppm |
| 3.73 | 8 ppm |
| 3.64 | 8 ppm |

0.98

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.64 | >= 512 ppm |
| 4.43 | >= 512 ppm |
| 4.25 | 64 ppm |
| 3.99 | 16 ppm |
| 3.48 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.49 | >= 512 ppm |
| 4.32 | >= 512 ppm |
| 4.07 | >= 512 ppm |
| 3.82 | >= 512 ppm |
| 3.58 | 128 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.61 | >= 512 ppm |
| 4.36 | >= 512 ppm |
| 4.06 | 32 ppm |
| 3.86 | 8 ppm |
| 3.57 | <= 4 ppm |

0.97

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.55 | >= 512 ppm |
| 4.07 | >= 512 ppm |
| 3.97 | >= 512 ppm |
| 3.76 | <= 4 ppm |
| 3.5 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.65 | >= 512 ppm |
| 4.19 | 64 ppm |
| 3.9 | 16 ppm |
| 3.59 | 8 ppm |
| 3.5 | 8 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.58 | >= 512 ppm |
| 4.45 | >= 512 ppm |
| 3.99 | >= 512 ppm |
| 3.74 | >= 512 ppm |
| 3.46 | 8 ppm |

0.96

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.55 | >= 512 ppm |
| 4.11 | >= 512 ppm |
| 3.84 | <= 4 ppm |
| 3.67 | <= 4 ppm |
| 3.46 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.54 | >= 512 ppm |
| 4.29 | 8 ppm |
| 3.93 | <= 4 ppm |
| 3.77 | <= 4 ppm |
| 3.61 | <= 4 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.51 | >= 512 ppm |
| 4.28 | >= 512 ppm |
| 4.09 | >= 512 ppm |
| 3.79 | >= 512 ppm |
| 3.56 | >= 512 ppm |

Tabla 2.4.3. Concentraciones mínimas inhibitorias de sorbato de potasio al 5% para *Salmonella typhimurium*.

Salmonella typhimurium

0.99

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.58 | >= 512 ppm |
| 4.36 | >= 512 ppm |
| 4.13 | 64 ppm |
| 3.72 | <= 4 ppm |
| 3.56 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|-----------|
| 4.52 | >= 512ppm |
| 4.31 | >= 512ppm |
| 4.13 | >= 512ppm |
| 3.82 | >= 512ppm |
| 3.53 | >= 512ppm |

| pH | Glicerol |
|------|-----------|
| 4.6 | >=512 ppm |
| 4.34 | 64 ppm |
| 4.12 | 32 ppm |
| 3.73 | 32 ppm |
| 3.64 | 16 ppm |

0.98

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.64 | >= 512 ppm |
| 4.43 | >= 512 ppm |
| 4.25 | 128 ppm |
| 3.99 | <= 4 ppm |
| 3.48 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.49 | >= 512 ppm |
| 4.32 | >= 512 ppm |
| 4.07 | >= 512 ppm |
| 3.82 | >= 512 ppm |
| 3.58 | <= 4 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.61 | >= 512 ppm |
| 4.36 | >= 512 ppm |
| 4.06 | 128 ppm |
| 3.86 | 64 ppm |
| 3.57 | <= 4 ppm |

0.97

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.55 | >= 512ppm |
| 4.07 | >= 512 ppm |
| 3.97 | >= 512 ppm |
| 3.76 | <= 4 ppm |
| 3.5 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.65 | >= 512 ppm |
| 4.19 | 64 ppm |
| 3.9 | 16 ppm |
| 3.59 | 8 ppm |
| 3.5 | 8 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.58 | >= 512 ppm |
| 4.45 | >= 512 ppm |
| 3.99 | >= 512 ppm |
| 3.74 | >= 512 ppm |
| 3.46 | 64 ppm |

0.96

| pH | Sal |
|------|------------|
| 4.55 | >= 512 ppm |
| 4.11 | >= 512 ppm |
| 3.84 | 64 ppm |
| 3.67 | <= 4 ppm |
| 3.46 | <= 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|------------|
| 4.54 | >= 512 ppm |
| 4.29 | >= 512 ppm |
| 3.93 | <= 4 ppm |
| 3.77 | <= 4 ppm |
| 3.61 | <= 4 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|------------|
| 4.51 | >= 512 ppm |
| 4.28 | >= 512 ppm |
| 4.09 | >= 512 ppm |
| 3.79 | >= 512 ppm |
| 3.56 | >= 512 ppm |

Tabla 2.4.4. Concentraciones mínimas inhibitorias de sorbato de potasio al 5% para *Escherichia coli*.

E. coli

0.99

| pH | Sal |
|------|----------------|
| 4.58 | ≥ 512 ppm |
| 4.36 | ≥ 512 ppm |
| 4.13 | 32 ppm |
| 3.72 | 32 ppm |
| 3.56 | ≤ 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|----------------|
| 4.52 | ≥ 512 ppm |
| 4.31 | ≥ 512 ppm |
| 4.13 | ≥ 512 ppm |
| 3.82 | 128 ppm |
| 3.53 | 128 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|----------------|
| 4.6 | ≥ 512 ppm |
| 4.34 | ≥ 512 ppm |
| 4.12 | ≥ 512 ppm |
| 3.73 | ≥ 512 ppm |
| 3.64 | ≥ 512 ppm |

0.98

| pH | Sal |
|------|----------------|
| 4.64 | ≥ 512 ppm |
| 4.43 | ≥ 512 ppm |
| 4.25 | 32 ppm |
| 3.99 | 8 ppm |
| 3.48 | 8 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|----------------|
| 4.49 | ≥ 512 ppm |
| 4.32 | ≥ 512 ppm |
| 4.07 | ≥ 512 ppm |
| 3.82 | ≥ 512 ppm |
| 3.58 | 32 ppm |

| pH | Glicerol |
|------|----------------|
| 4.61 | ≥ 512 ppm |
| 4.36 | ≥ 512 ppm |
| 4.06 | 64 ppm |
| 3.86 | 64 ppm |
| 3.57 | ≥ 4 ppm |

0.97

| pH | Sal |
|------|----------------|
| 4.55 | ≥ 512 ppm |
| 4.07 | ≥ 512 ppm |
| 3.97 | ≥ 512 ppm |
| 3.76 | ≤ 4 ppm |
| 3.5 | ≤ 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|----------------|
| 4.65 | ≥ 512 ppm |
| 4.19 | ≥ 512 ppm |
| 3.9 | ≥ 512 ppm |
| 3.59 | ≥ 512 ppm |
| 3.5 | 64 ppm |

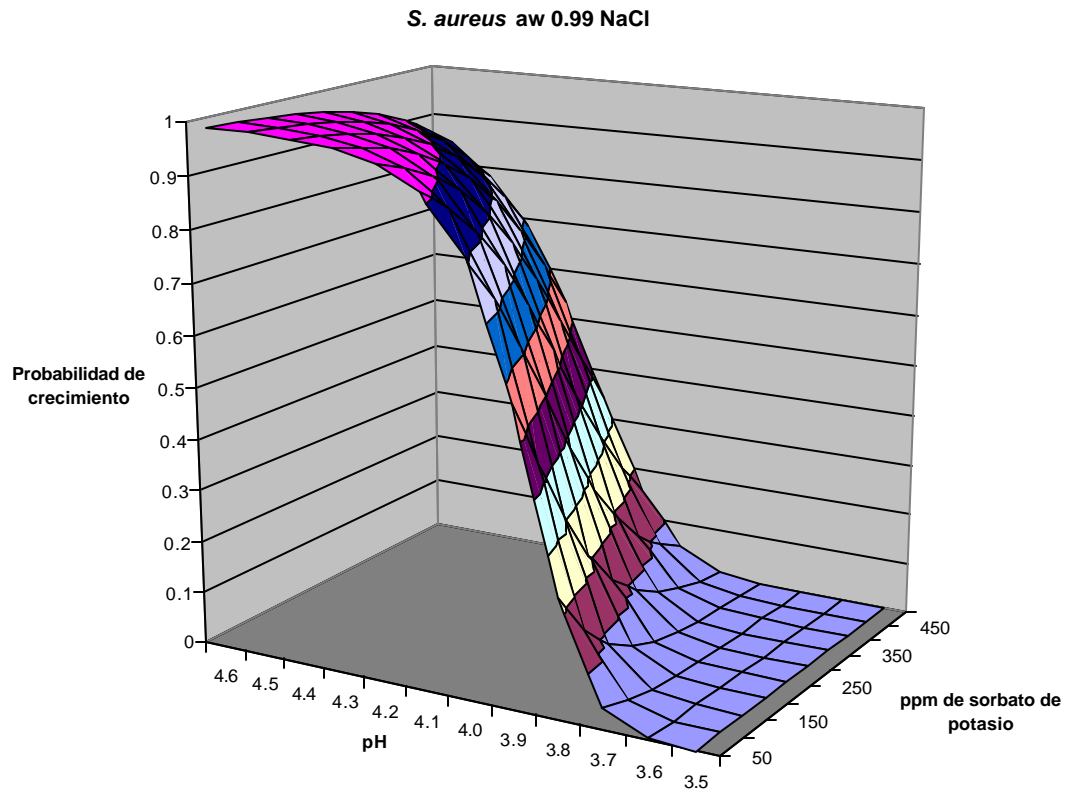
| pH | Glicerol |
|------|----------------|
| 4.58 | ≥ 512 ppm |
| 4.45 | ≥ 512 ppm |
| 3.99 | ≥ 512 ppm |
| 3.74 | ≥ 512 ppm |
| 3.46 | ≥ 512 ppm |

0.96

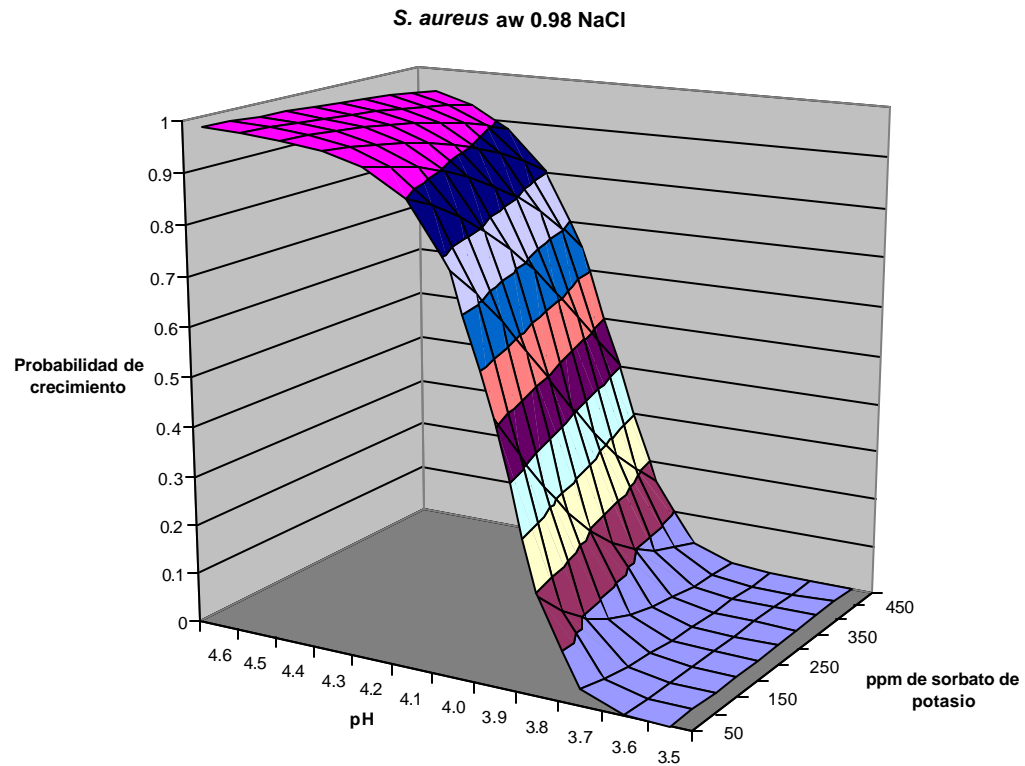
| pH | Sal |
|------|----------------|
| 4.55 | ≥ 512 ppm |
| 4.11 | ≥ 512 ppm |
| 3.84 | 256 ppm |
| 3.67 | ≤ 4 ppm |
| 3.46 | ≤ 4 ppm |

| pH | Azúcar |
|------|----------------|
| 4.54 | ≥ 512 ppm |
| 4.29 | ≥ 512 ppm |
| 3.93 | 128 ppm |
| 3.77 | ≤ 4 ppm |
| 3.61 | ≤ 4 ppm |

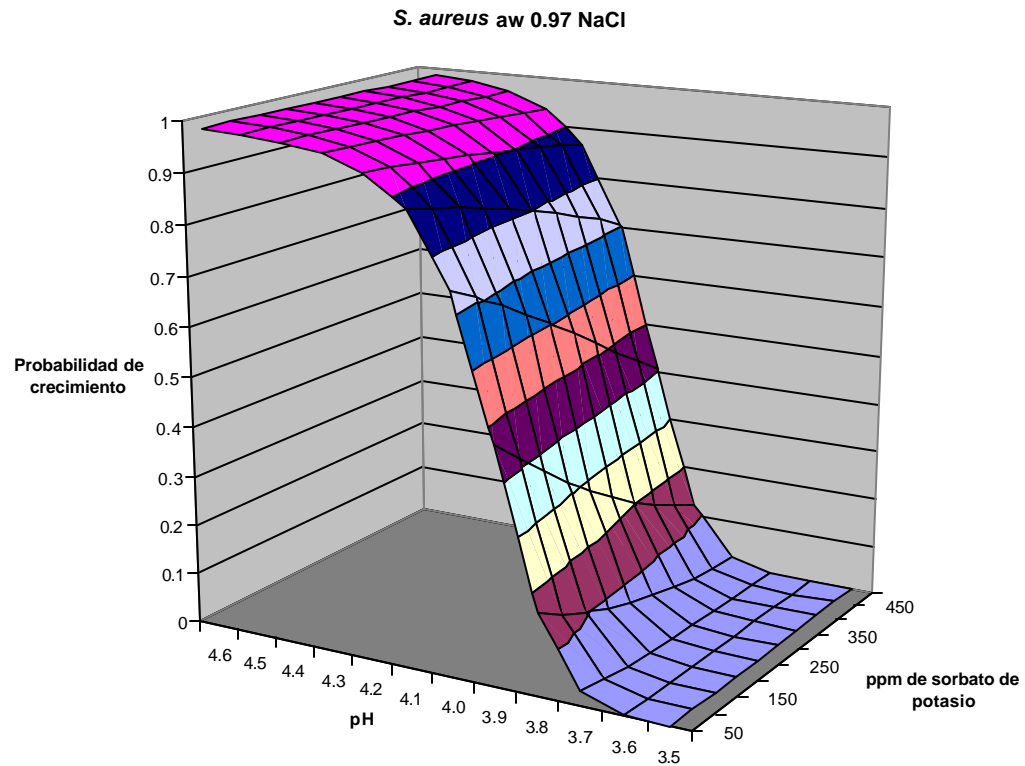
| pH | Glicerol |
|------|----------------|
| 4.51 | ≥ 512 ppm |
| 4.28 | ≥ 512 ppm |
| 4.09 | ≥ 512 ppm |
| 3.79 | ≥ 512 ppm |
| 3.56 | ≥ 512 ppm |



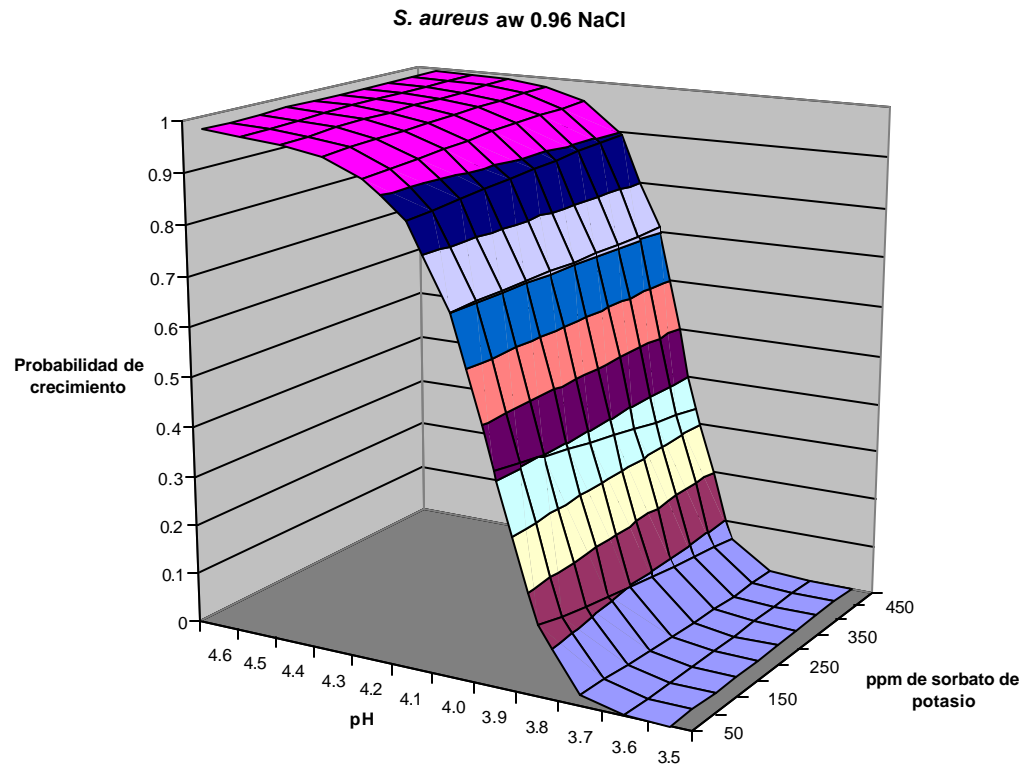
2.4.1 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando NaCl como soluto.



2.4.2 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando NaCl como soluto.

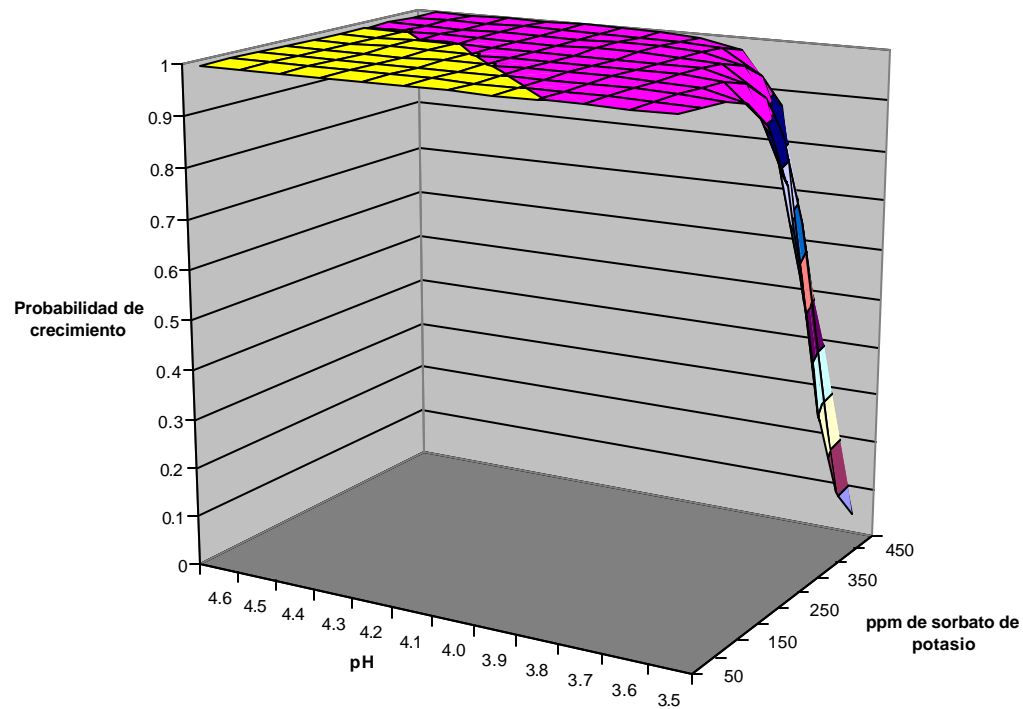


2.4.3 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando NaCl como soluto.



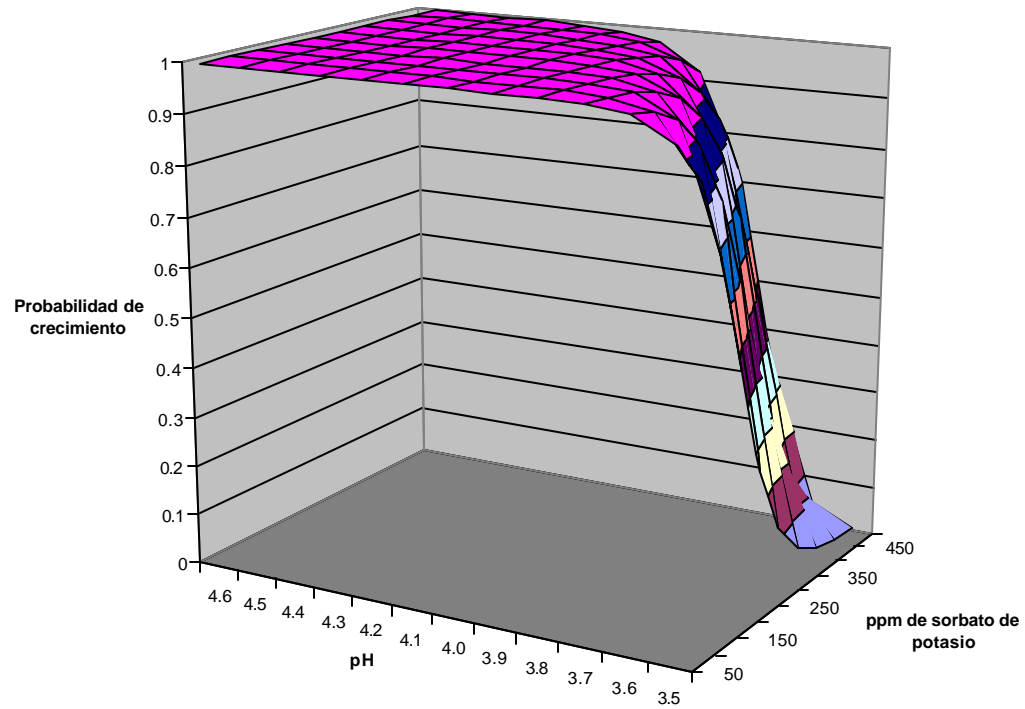
2.4.4 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando NaCl como soluto.

S. aureus aw 0.99 con Sacarosa

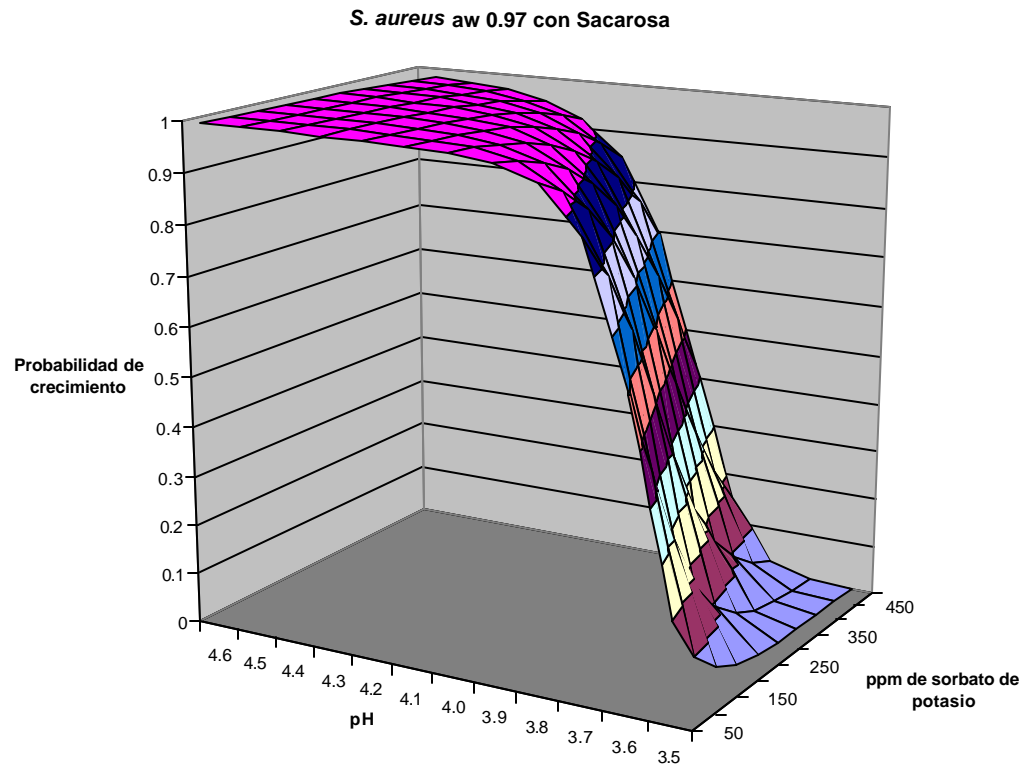


2.4.5 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Sacarosa como soluto.

S. aureus aw 0.98 con Sacarosa

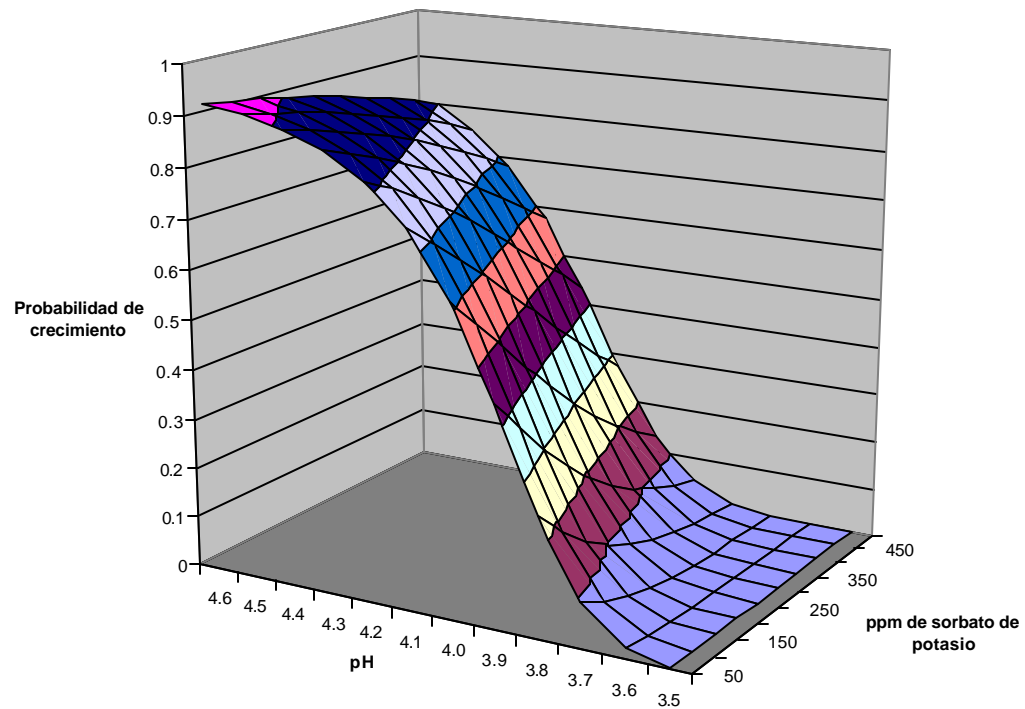


2.4.6 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Sacarosa como soluto.



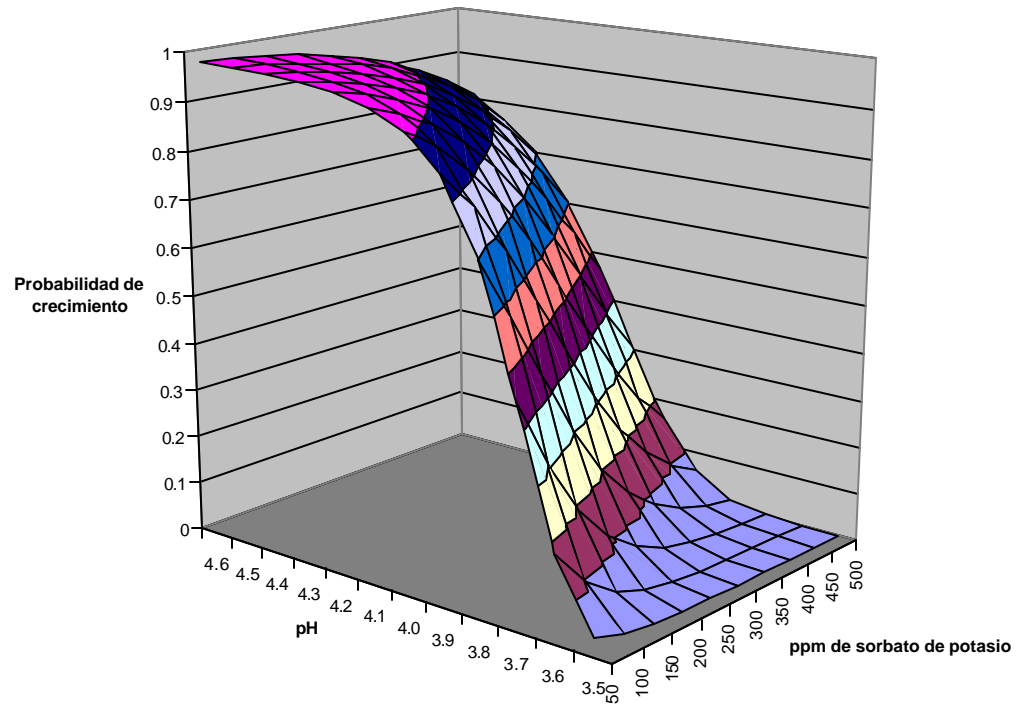
2.4.7 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Sacarosa como soluto

S. aureus aw 0.96 con Sacarosa



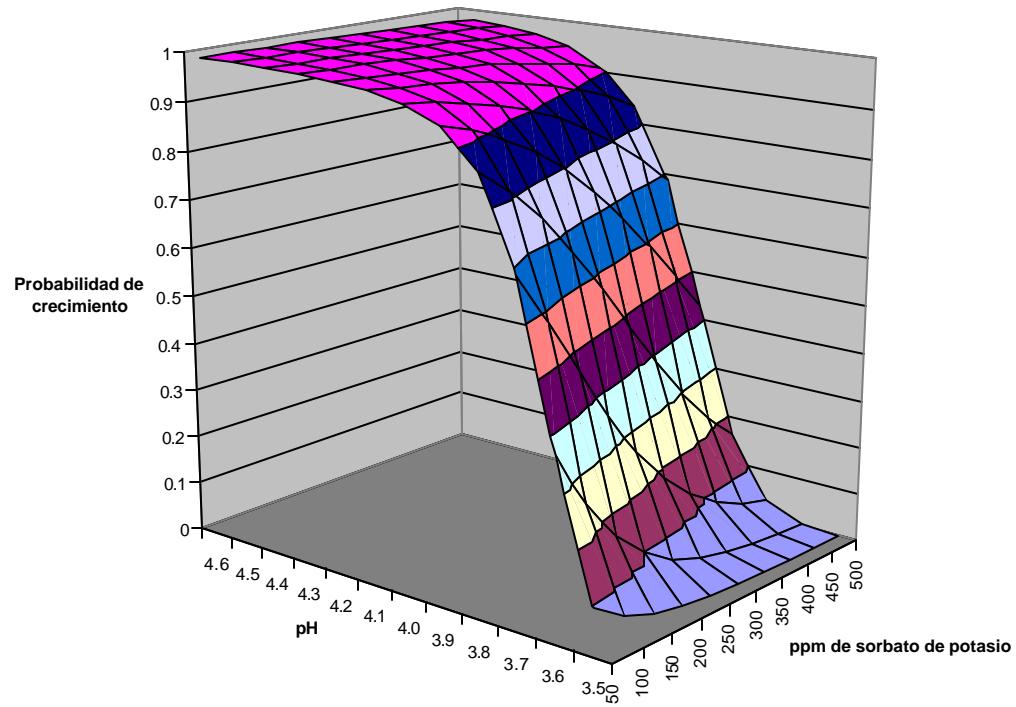
2.4.8 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Sacarosa como soluto.

***S. aureus* aw 0.99 con Glicerol**



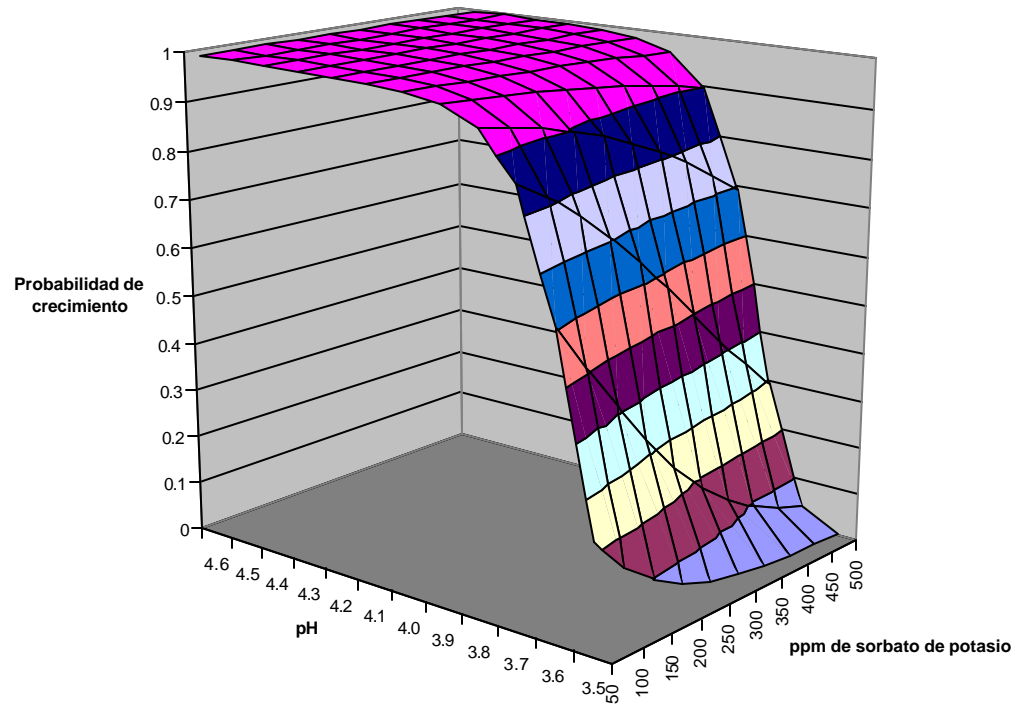
2.4.9 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Glicerol como soluto.

***S. aureus* aw 0.98 con Glicerol**



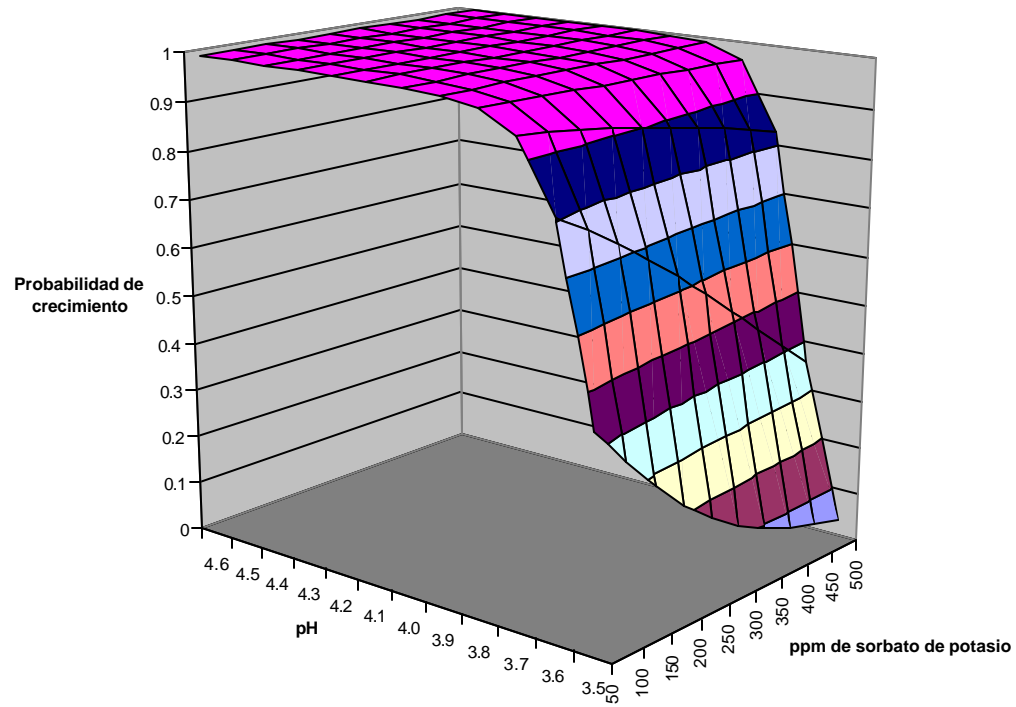
2.4.10 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Glicerol como soluto.

S. aureus aw 0.97 con Glicerol



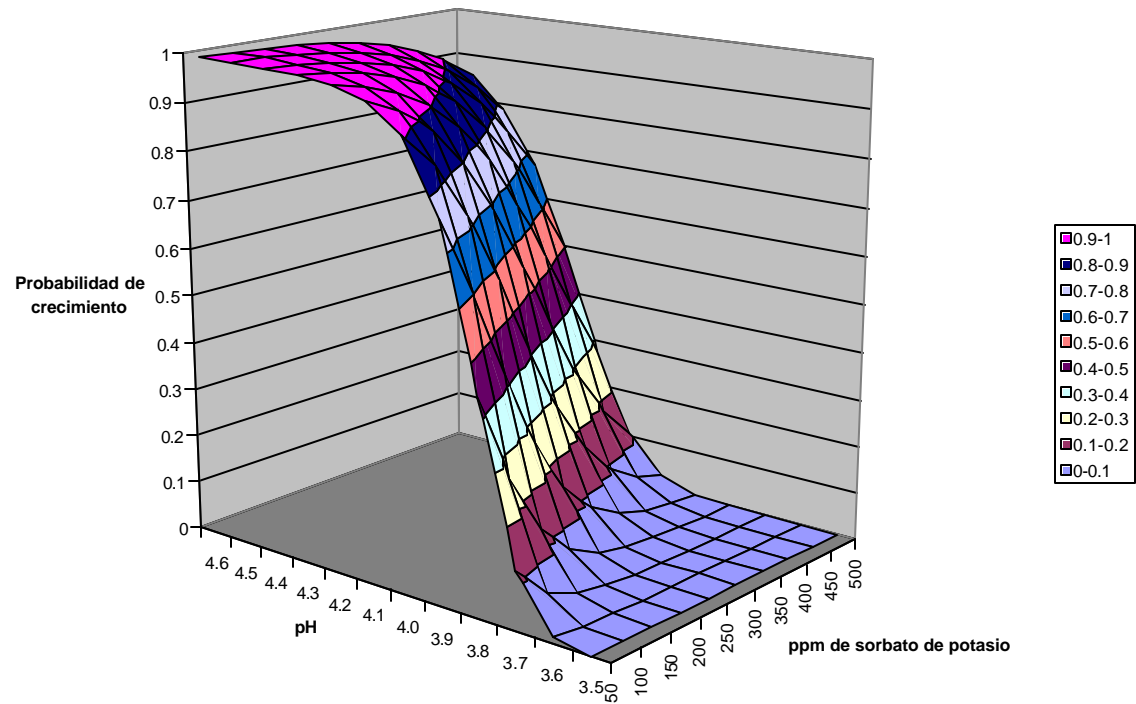
2.4.11 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Glicerol como soluto.

S. aureus aw 0.96 con Glicerol

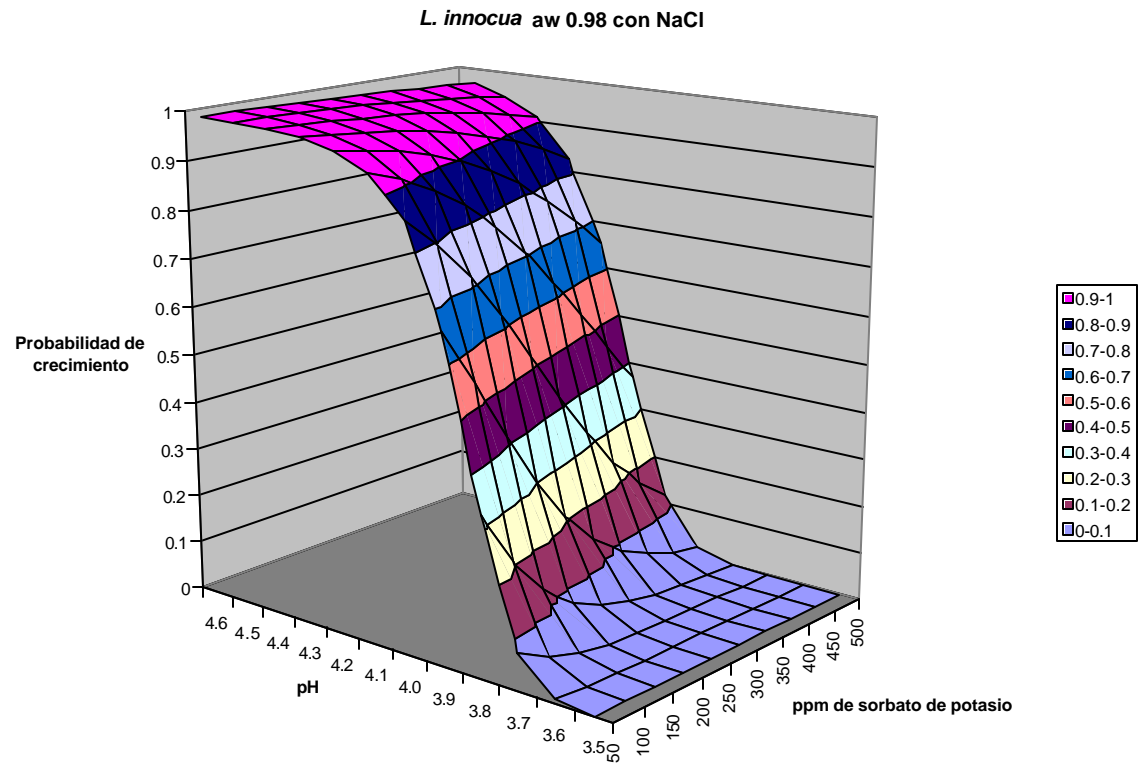


2.4.12 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *S. aureus* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Glicerol como soluto.

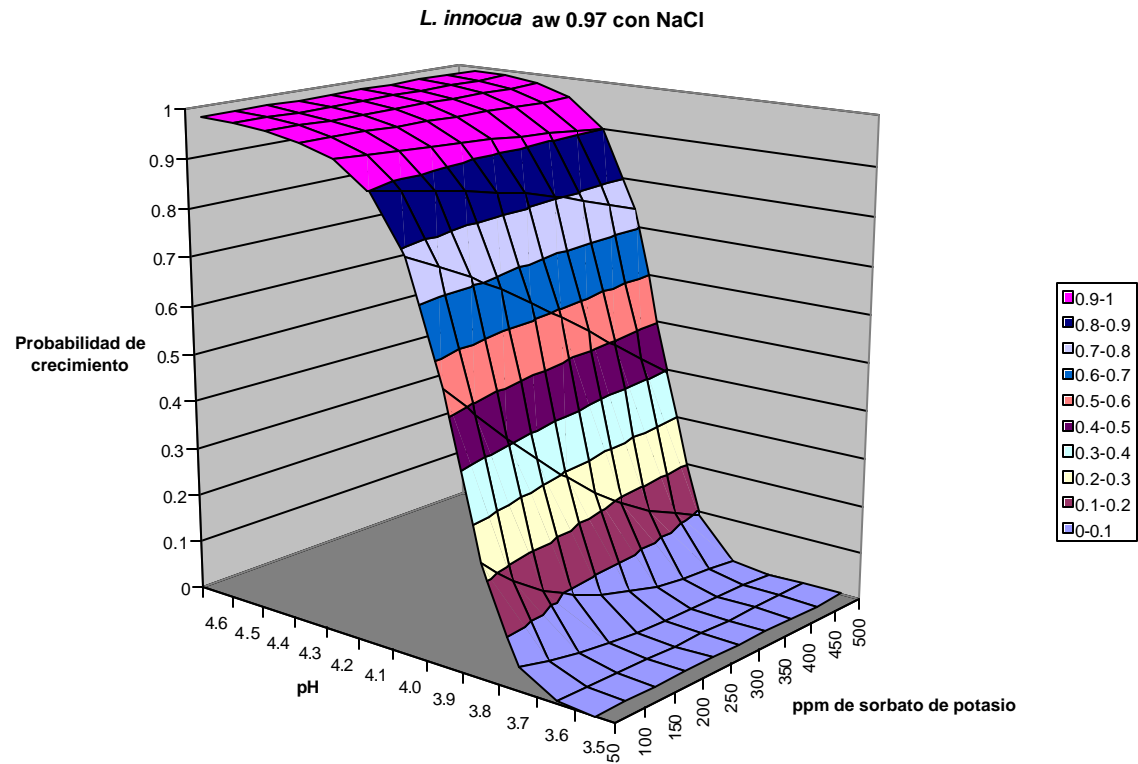
L. innocua aw 0.99 con NaCl



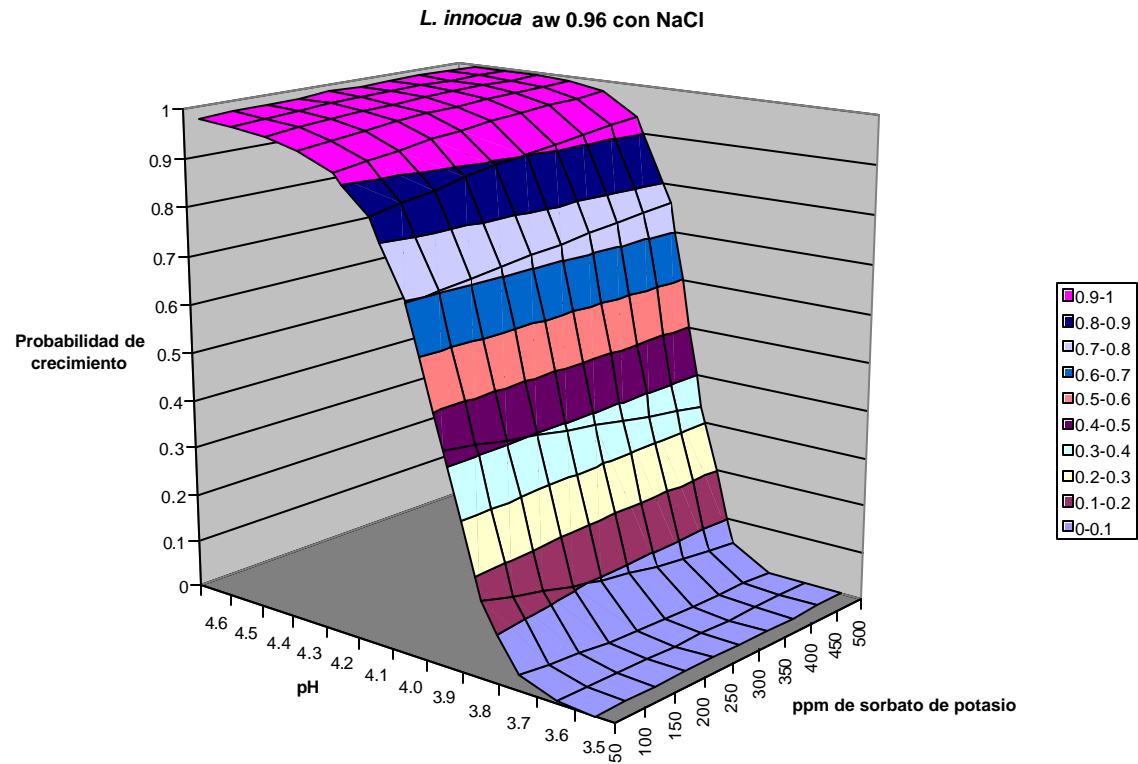
2.4.13 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando NaCl como soluto.



2.4.14 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando NaCl como soluto.

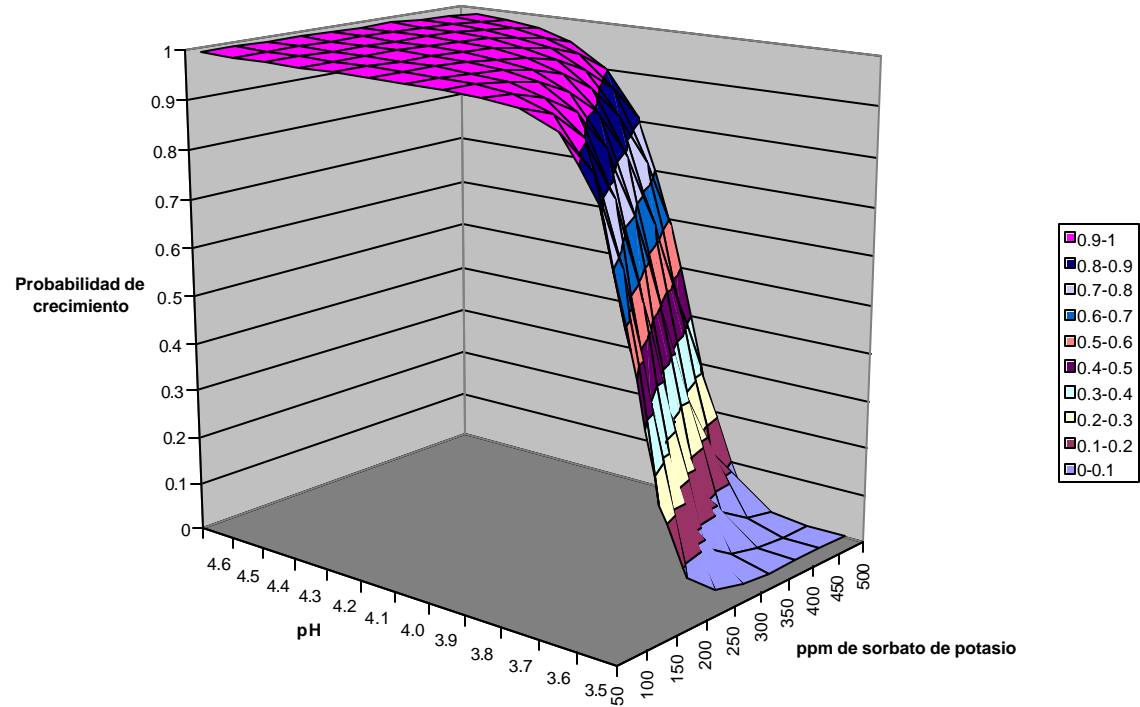


2.4.15 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando NaCl como soluto.



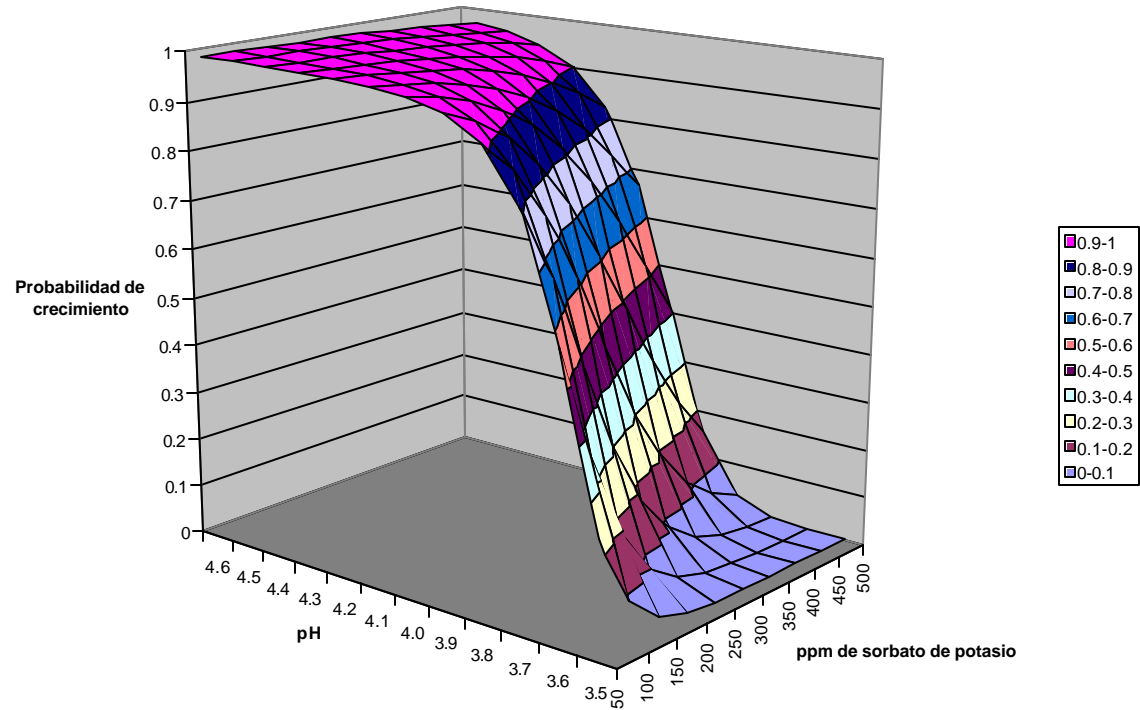
2.4.16 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando NaCl como soluto.

L. innocua aw 0.99 con Sacarosa



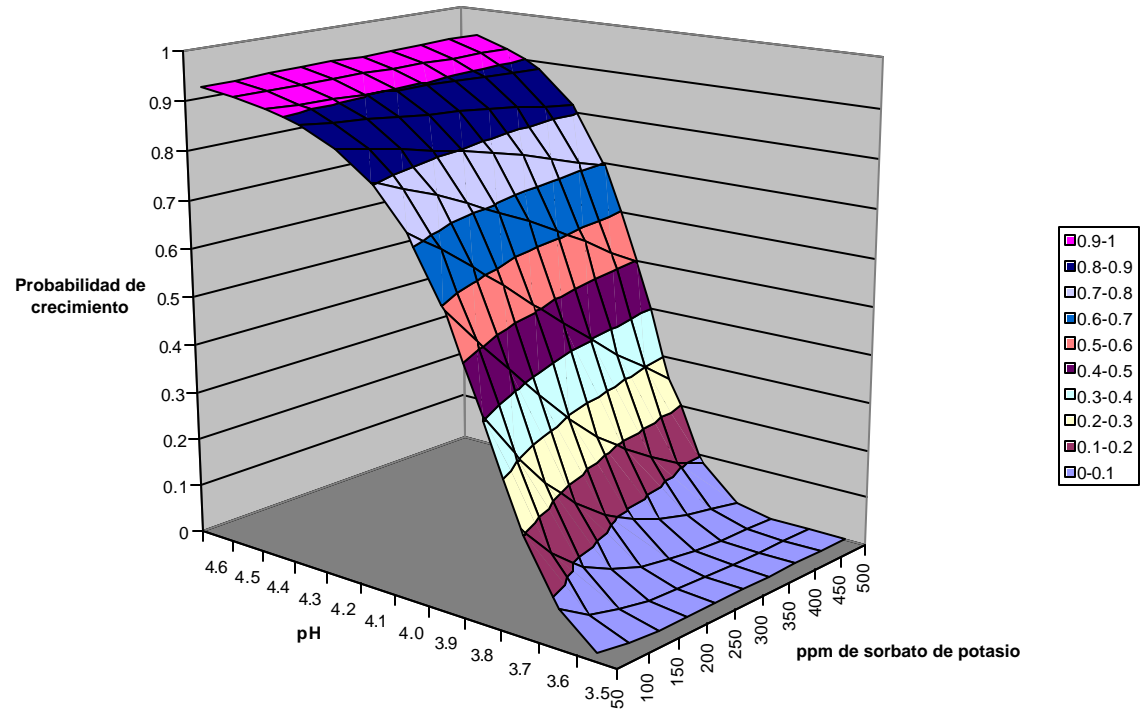
2.4.17 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Sacarosa como soluto.

L. innocua aw 0.98 con Sacarosa

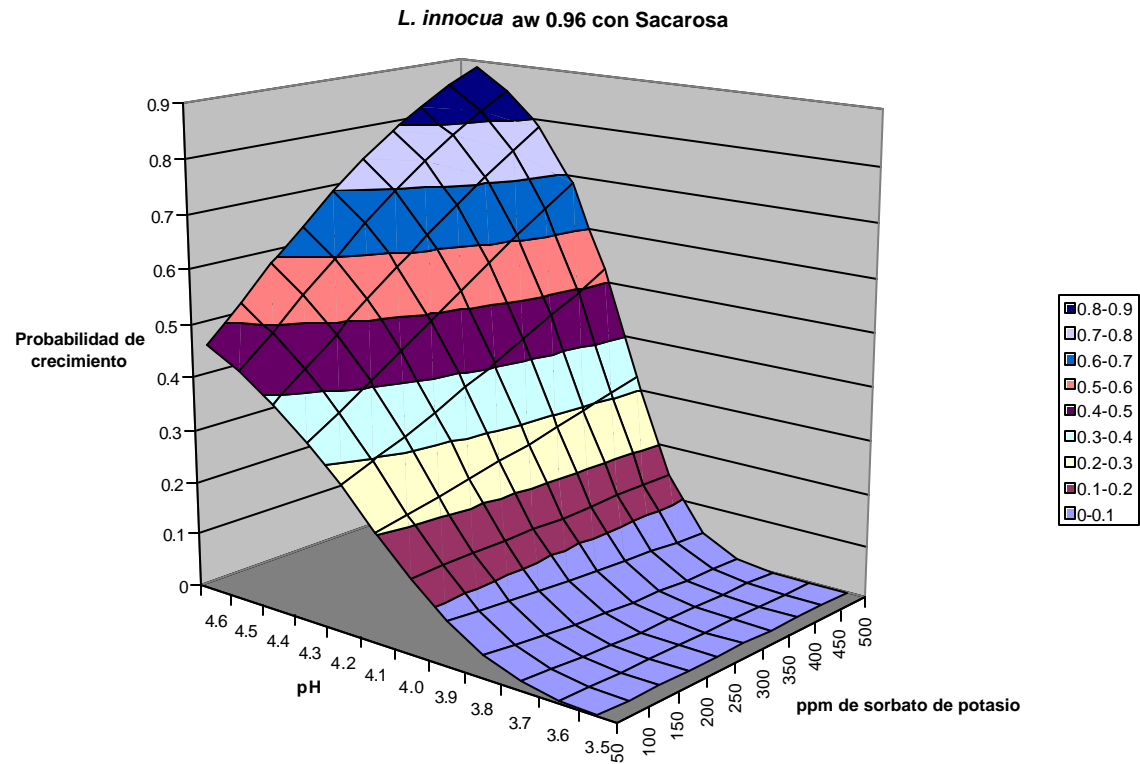


2.4.18 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Sacarosa como soluto.

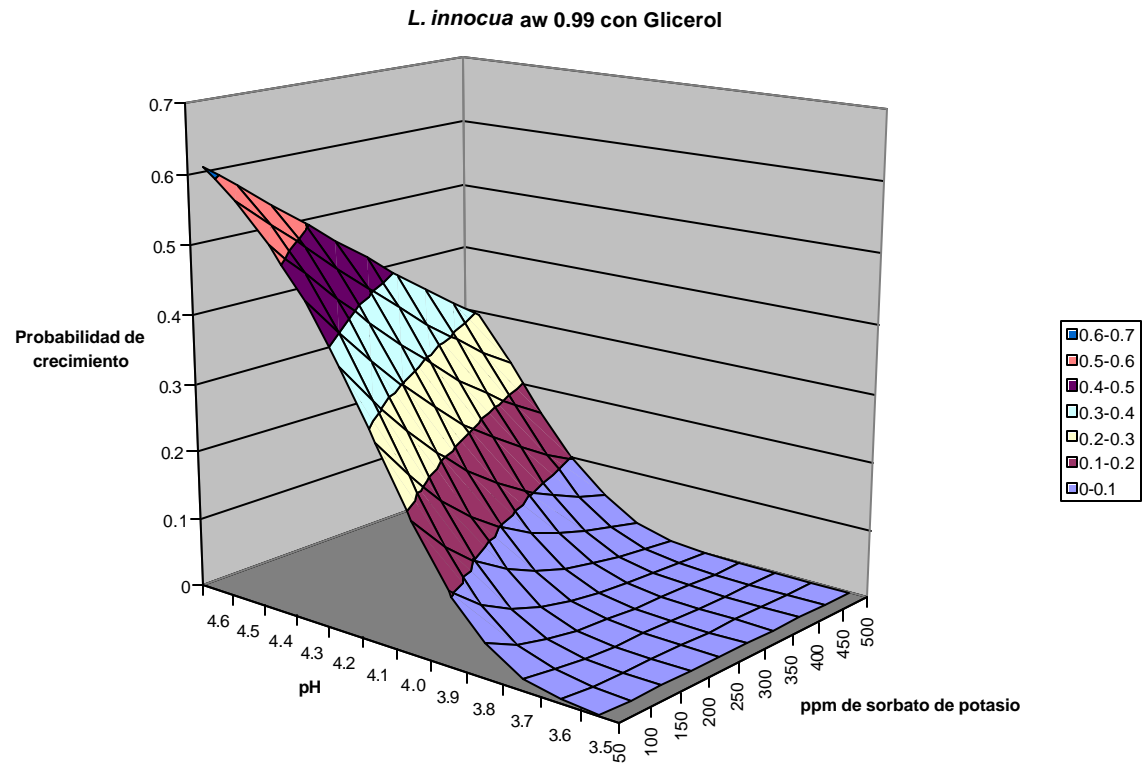
L. innocua aw 0.97 con Sacarosa



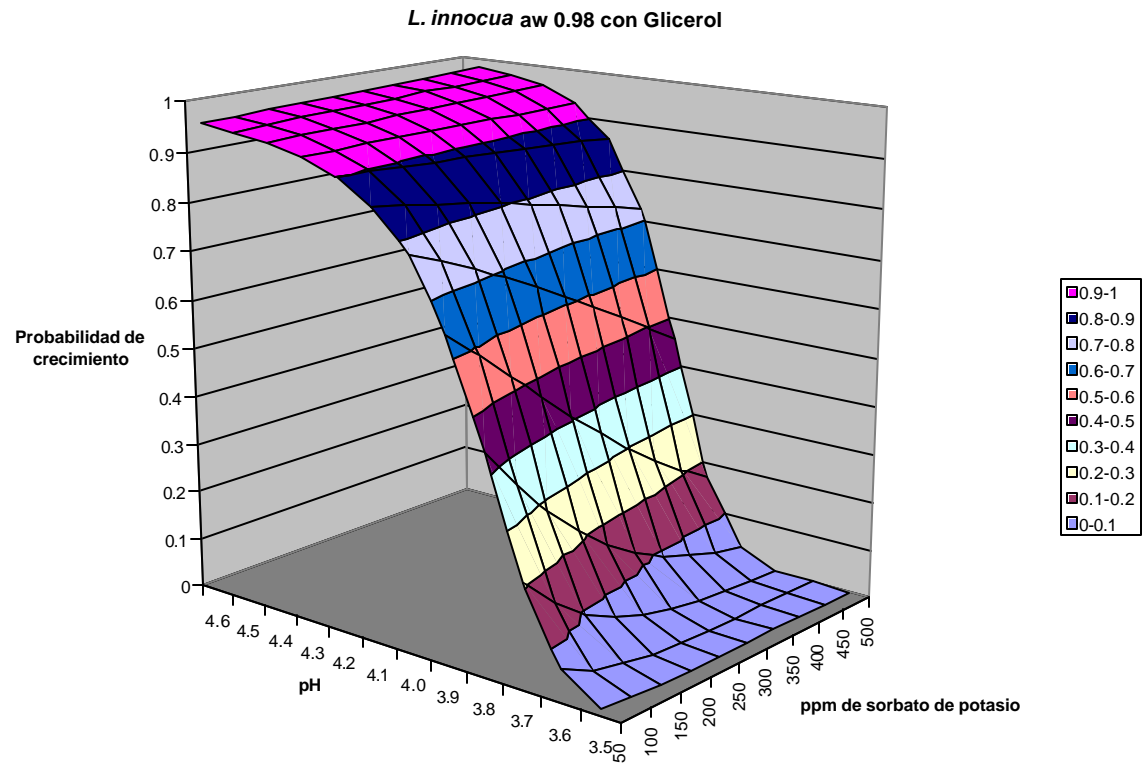
2.4.19 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Sacarosa como soluto.



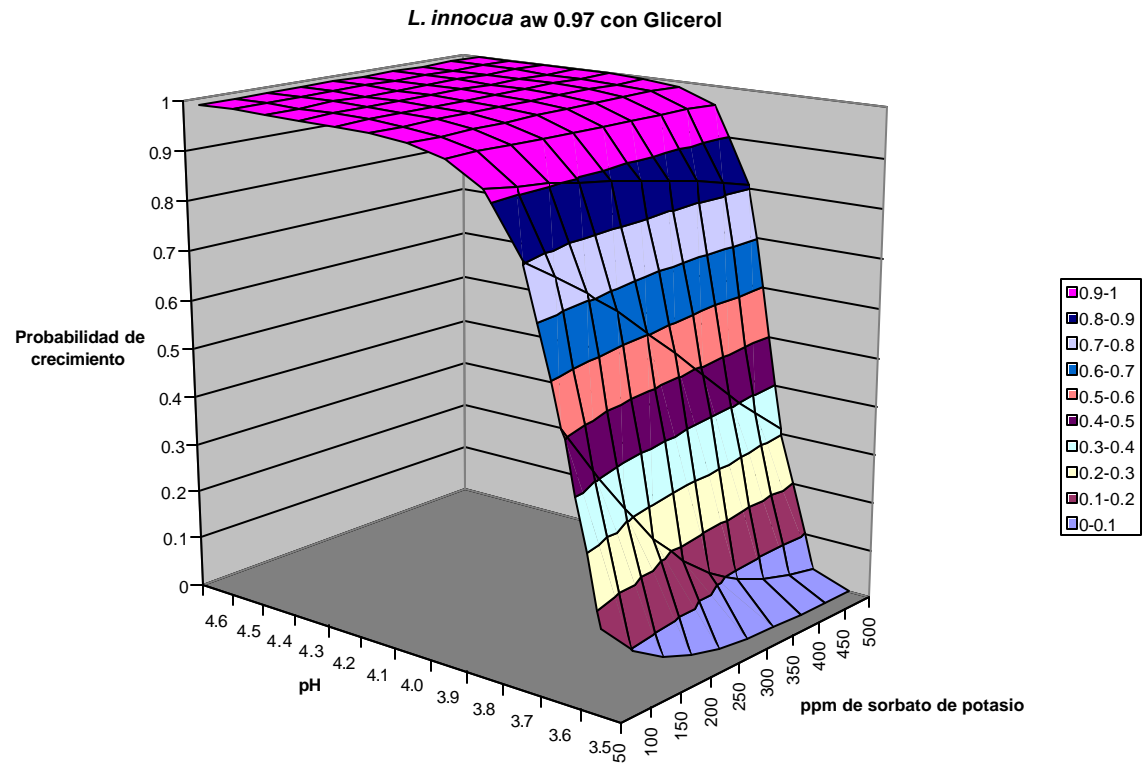
2.4.20 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Sacarosa como soluto.



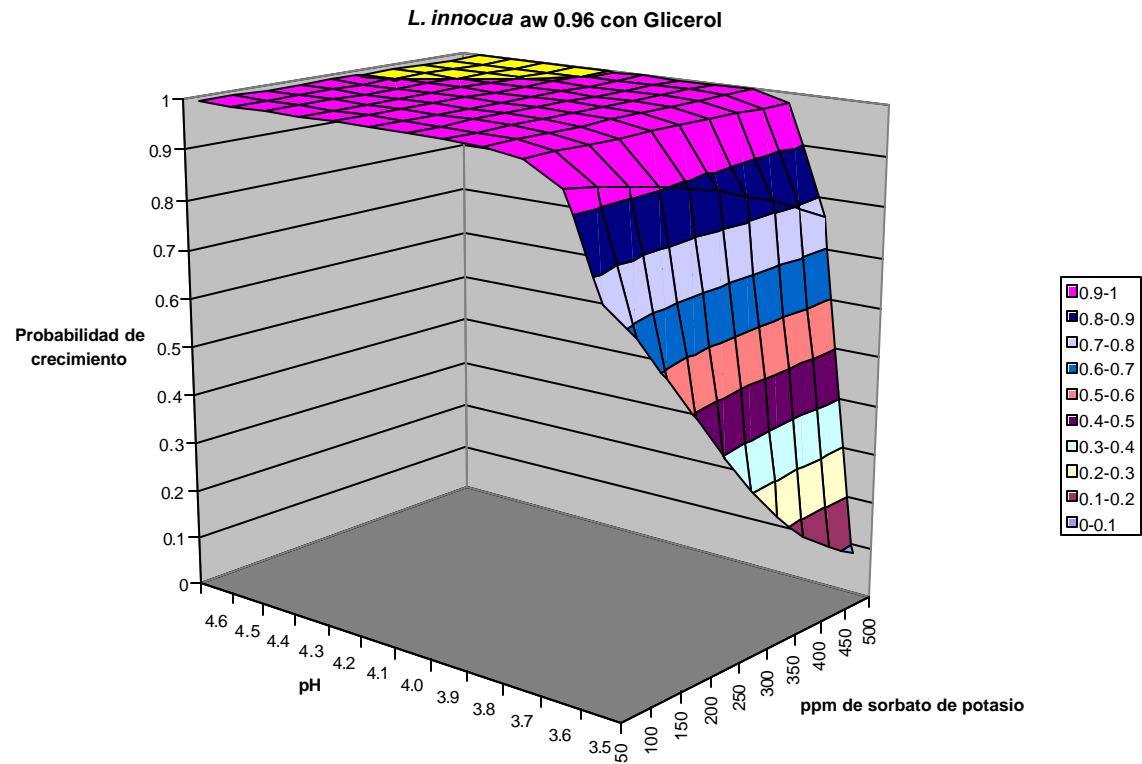
2.4.21 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Glicerol como soluto.



2.4.22 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Glicerol como soluto.

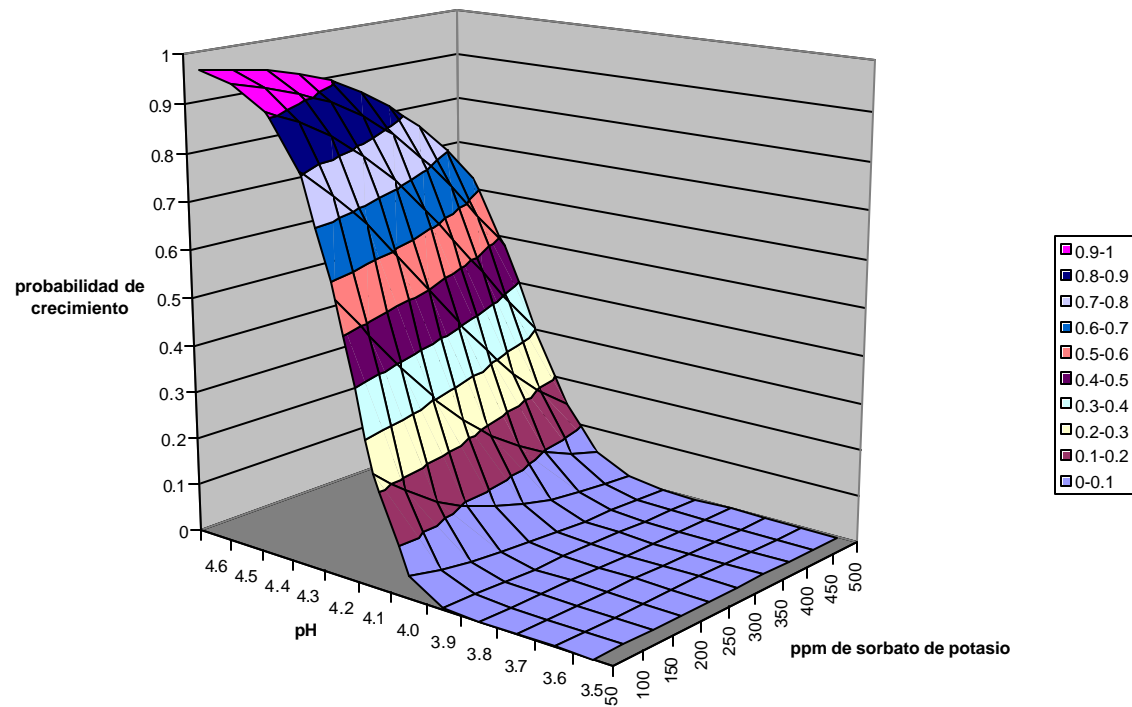


2.4.23 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Glicerol como soluto.



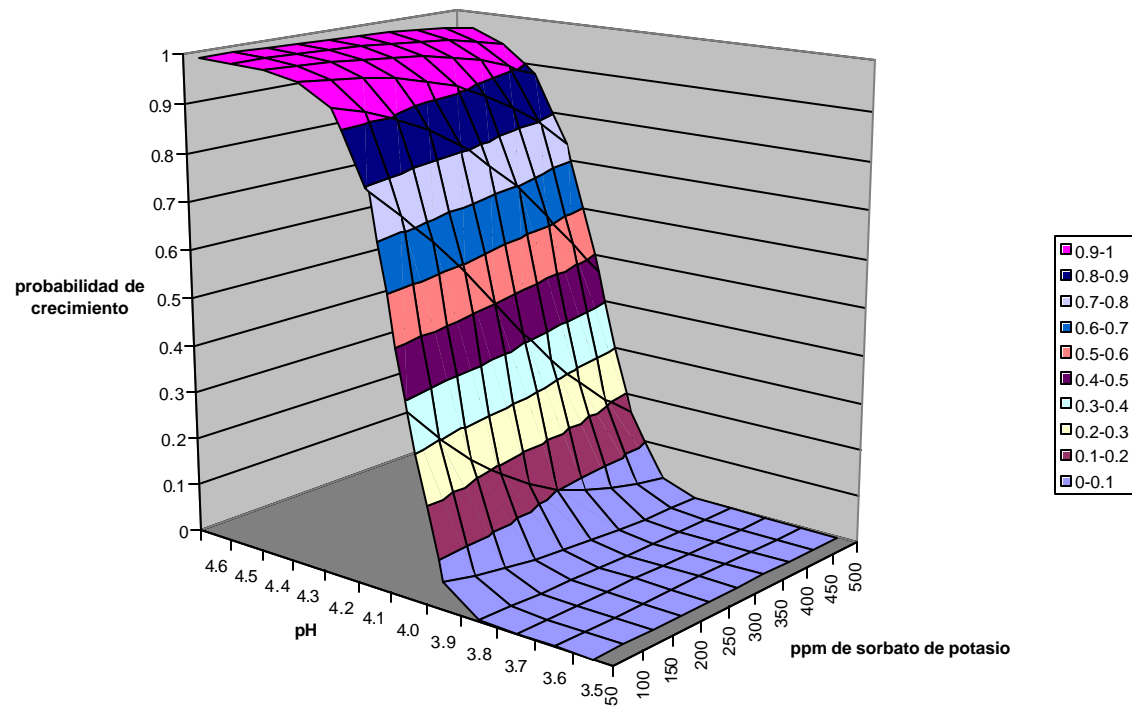
2.4.24 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Listeria innocua* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Glicerol como soluto.

S. typhimurium aw 0.99 con NaCl



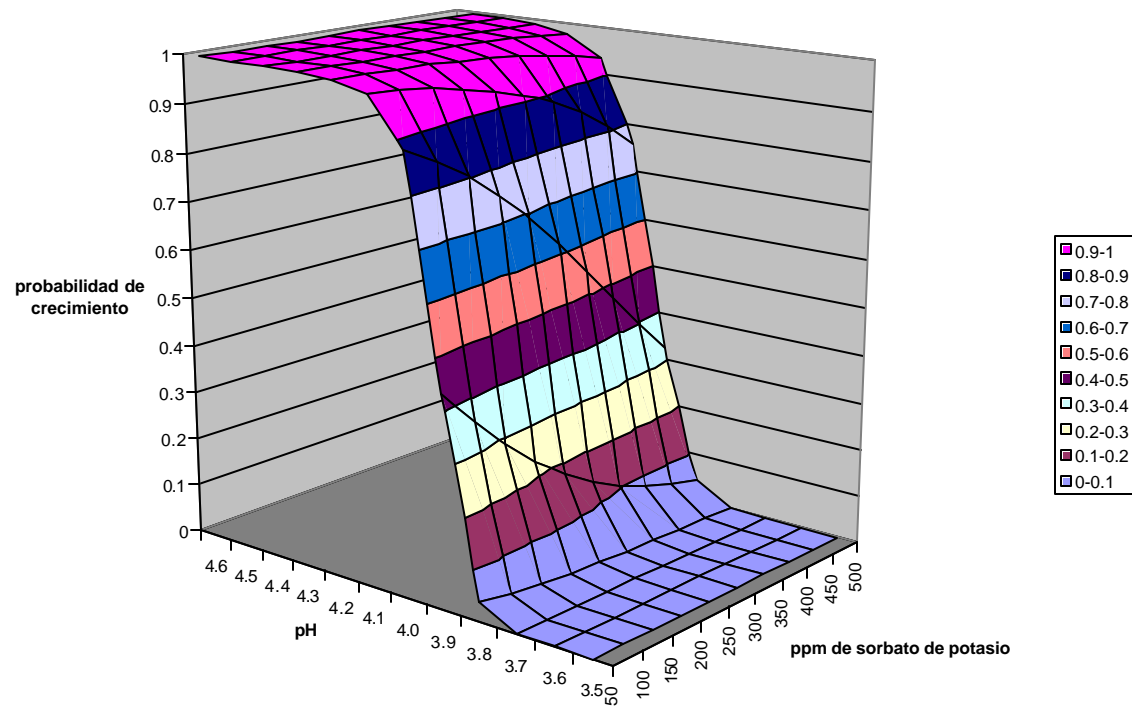
2.4.25 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando NaCl como soluto.

S. typhimurium aw 0.98 con NaCl



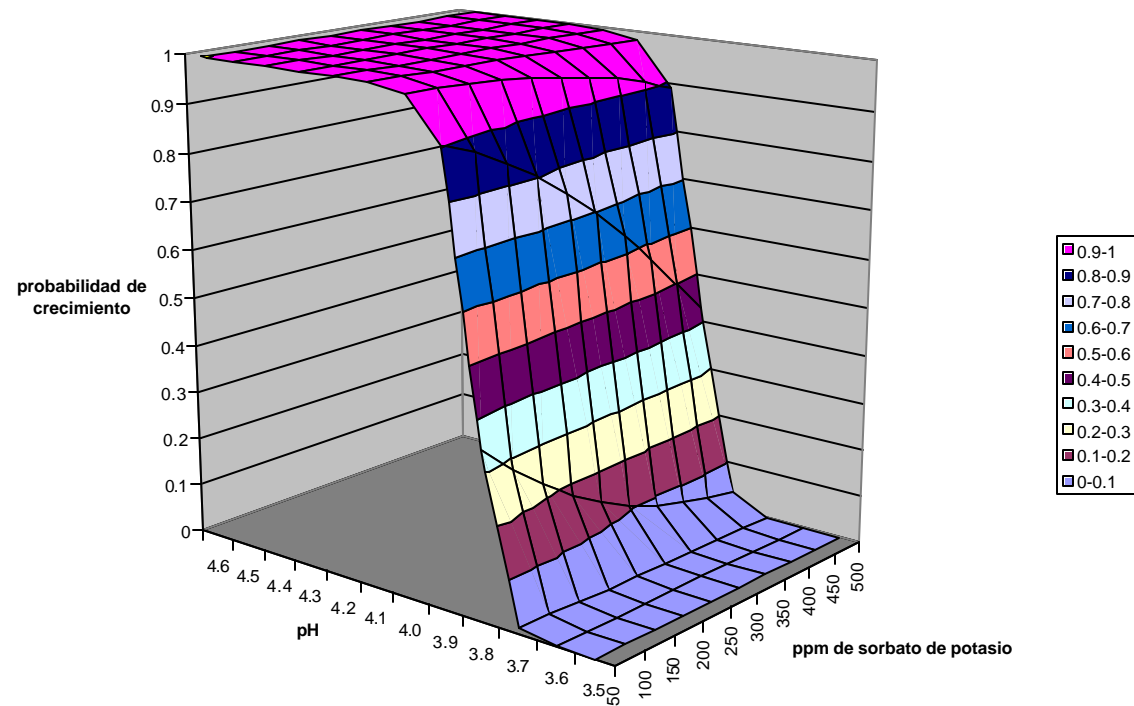
2.4.26 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando NaCl como soluto.

S. typhimurium aw 0.97 con NaCl



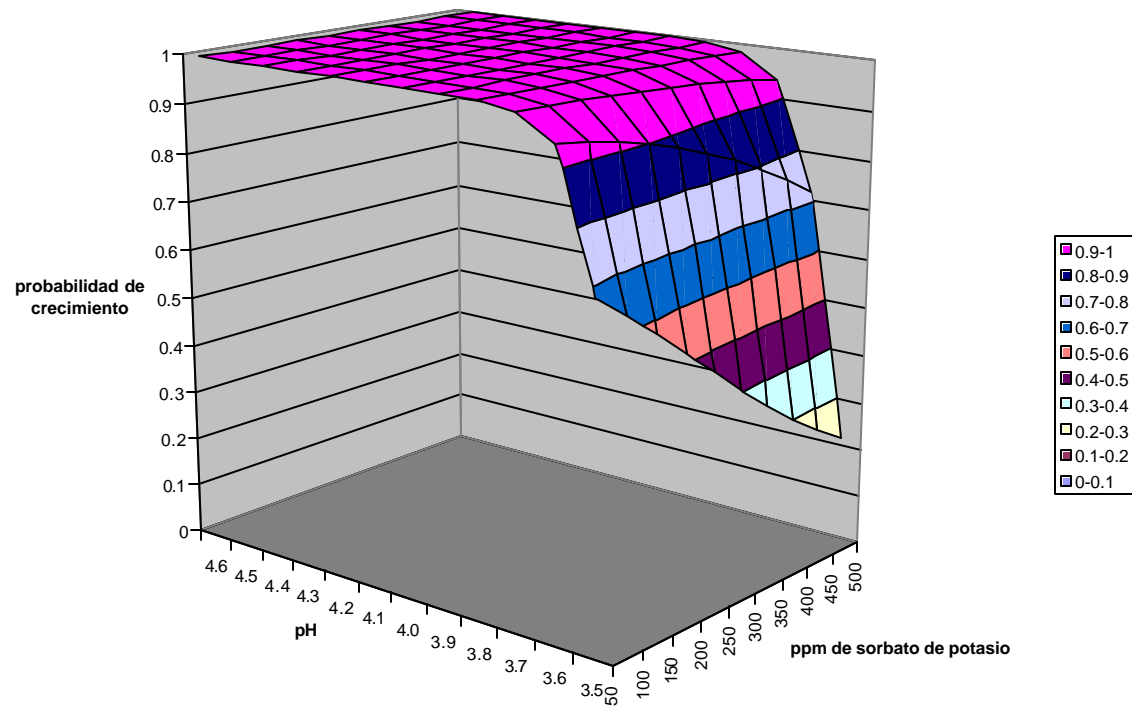
2.4.27 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando NaCl como soluto.

S. typhimurium aw 0.96 con NaCl



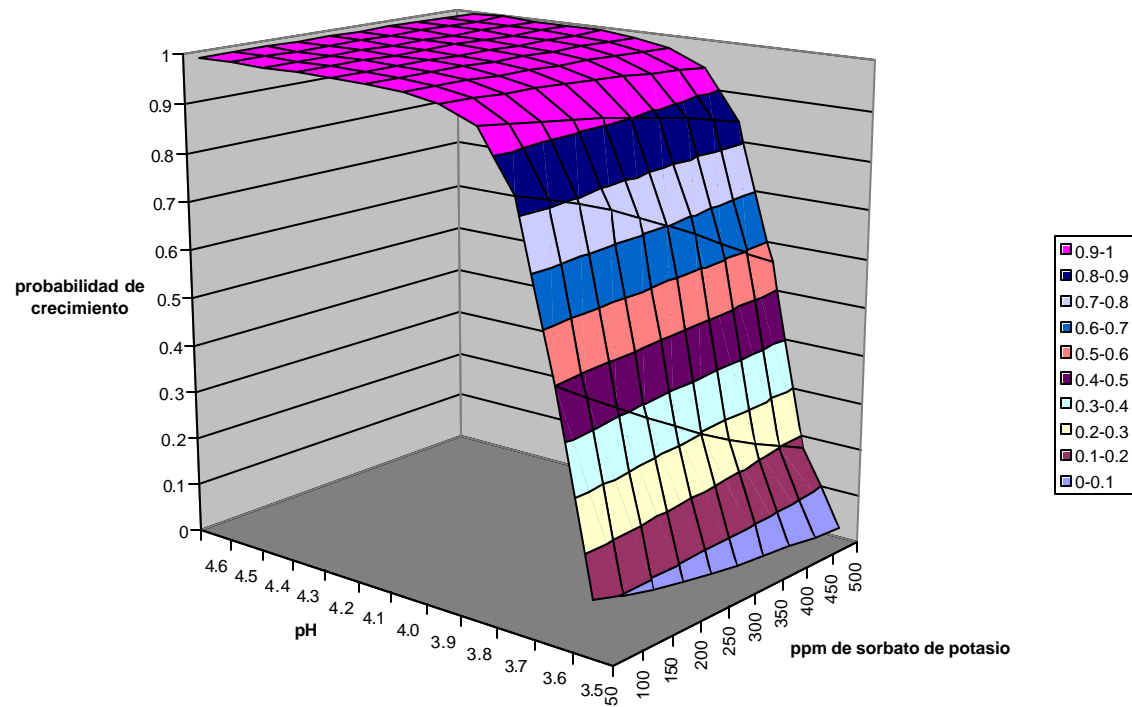
2.4.28 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando NaCl como soluto.

S. typhimurium aw 0.99 con Sacarosa



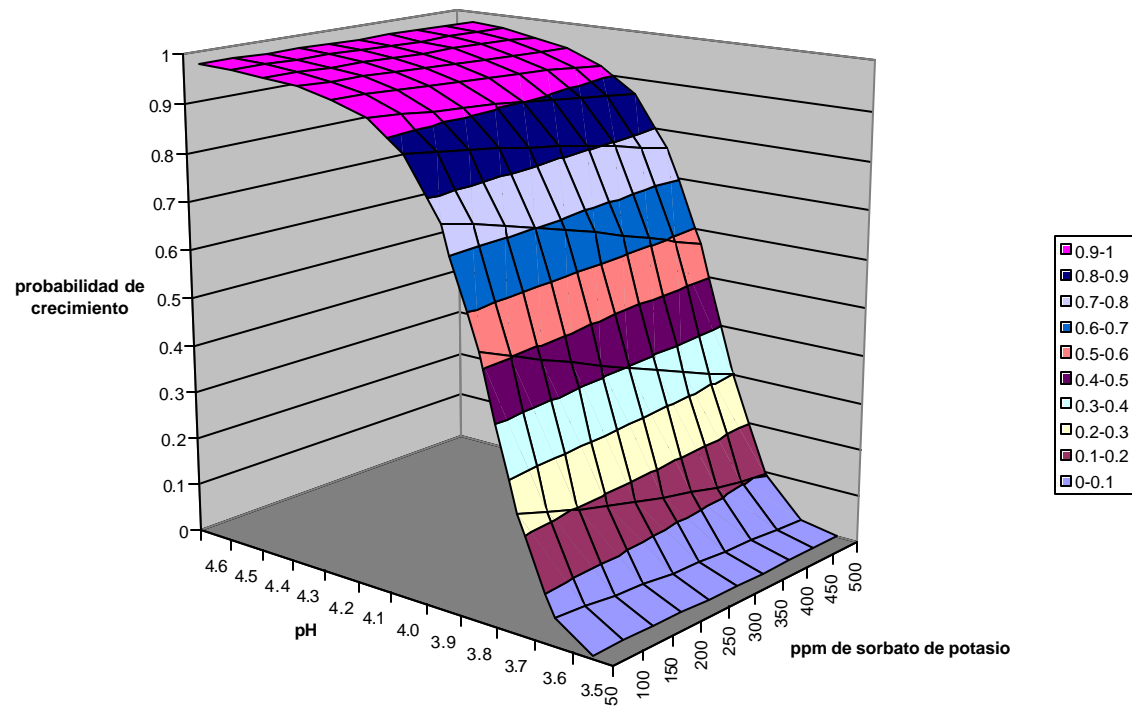
2.4.29 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Sacarosa como soluto.

S. typhimurium aw 0.98 con Sacarosa



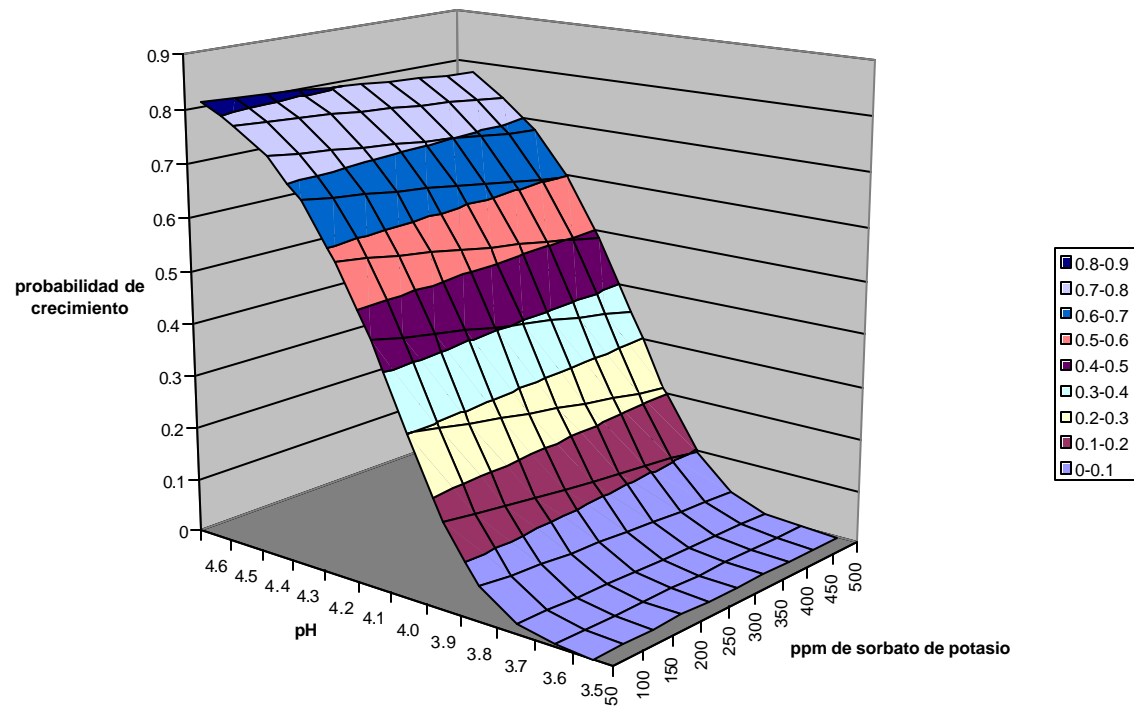
2.4.30 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Sacarosa como soluto.

S. typhimurium aw 0.97 con Sacarosa



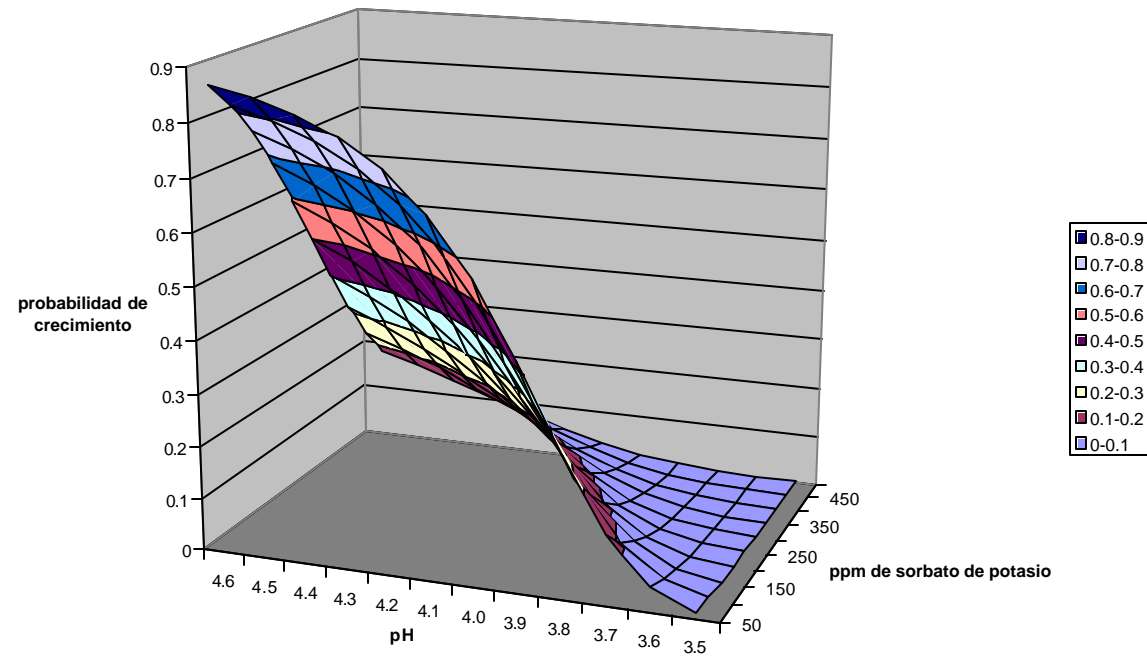
2.4.31 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Sacarosa como soluto.

S. typhimurium aw 0.96 con Sacarosa



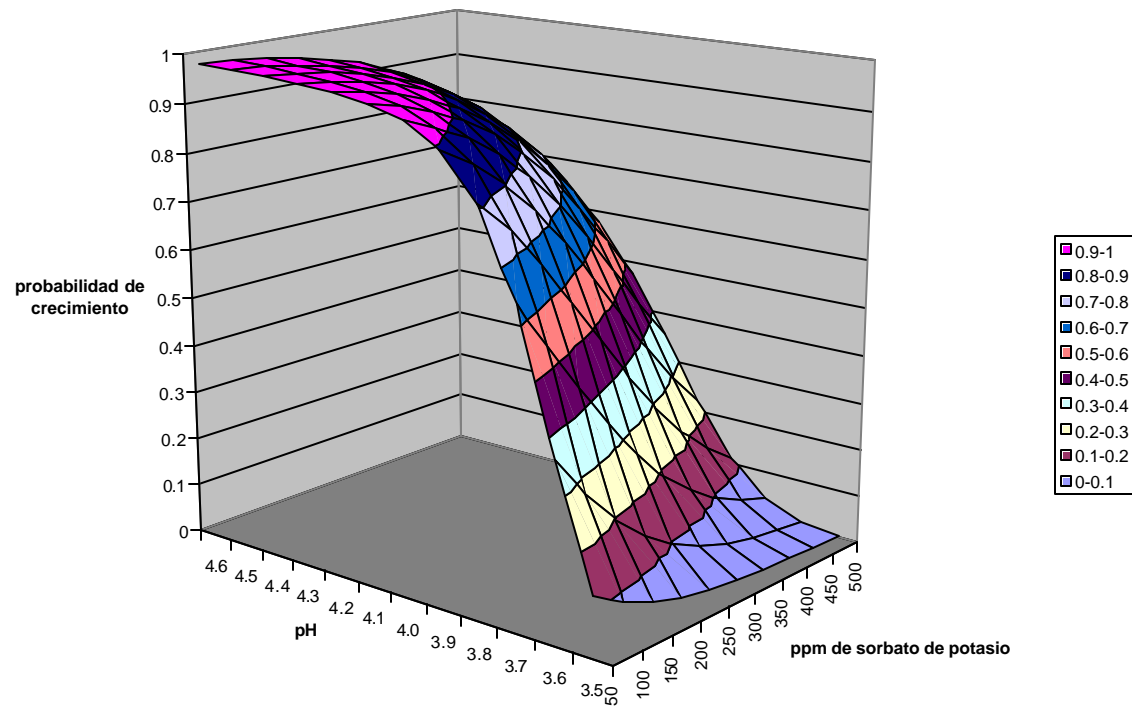
2.4.32 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Sacarosa como soluto.

S. typhimurium aw 0.99 con Glicerol



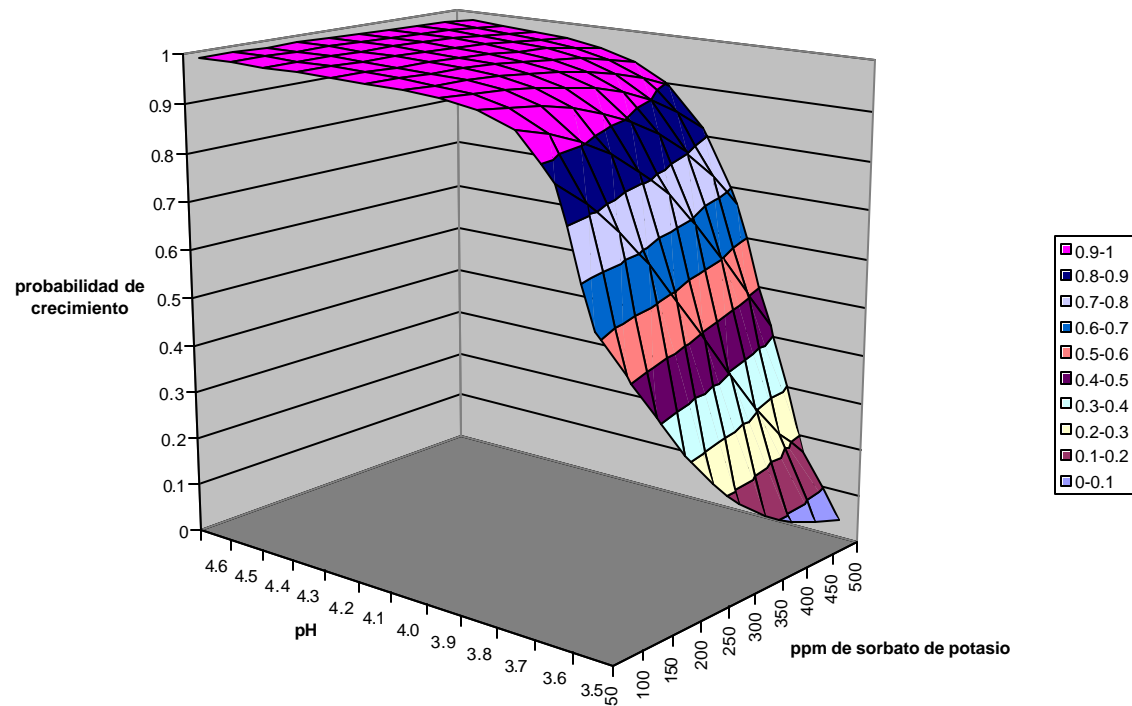
2.4.33 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Glicerol como soluto.

S. typhimurium aw 0.98 con glicerol



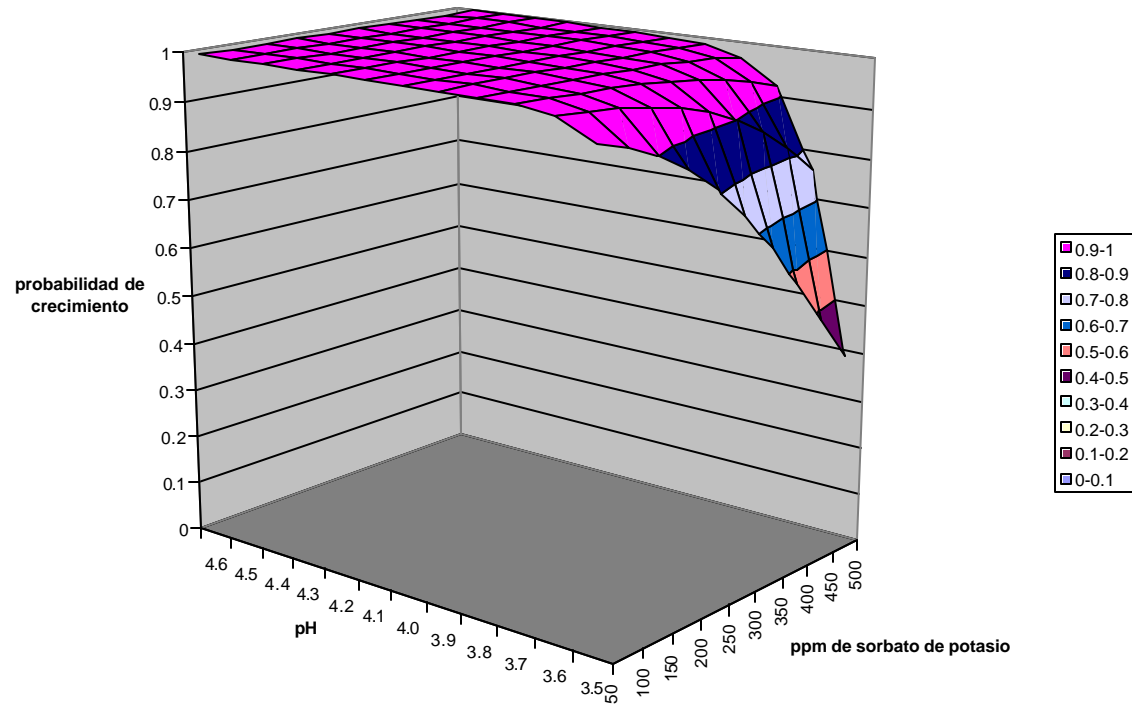
2.4.34 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Glicerol como soluto.

S. typhimurium aw 0.97 con Glicerol



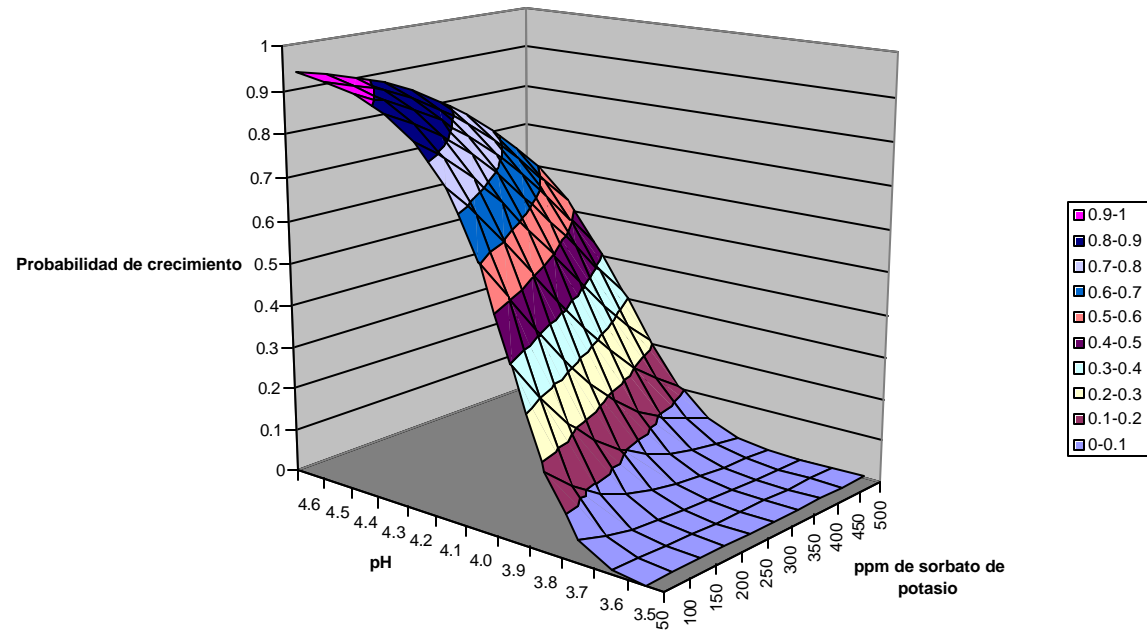
2.4.35 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Glicerol como soluto.

S. typhimurium aw 0.96 con Glicerol



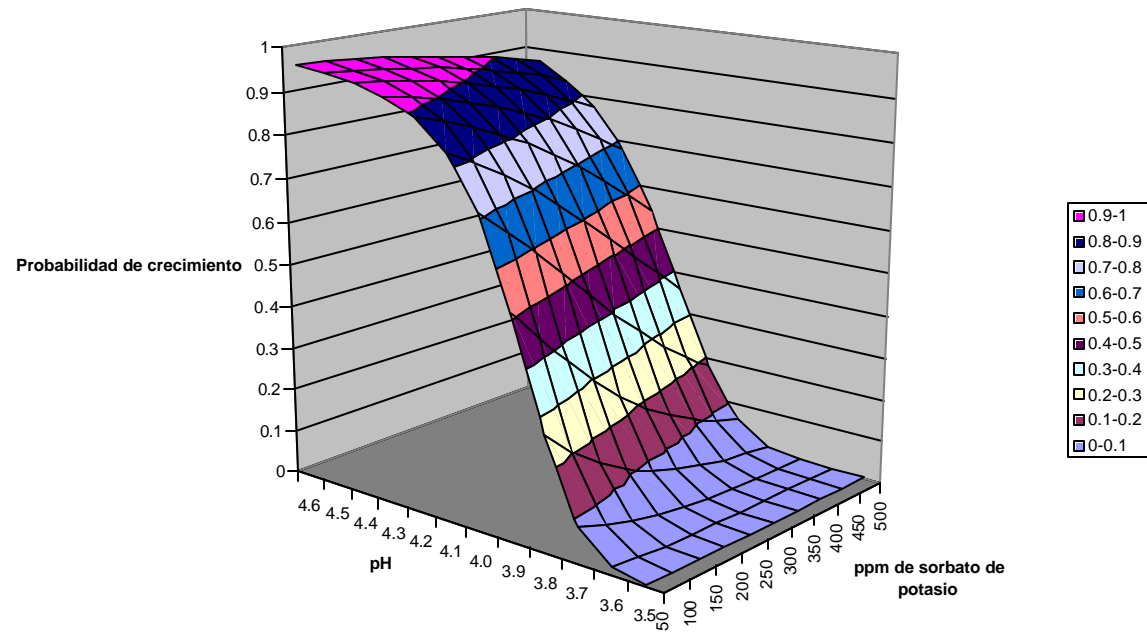
2.4.36 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Glicerol como soluto.

E. coli aw 0.99 con NaCl



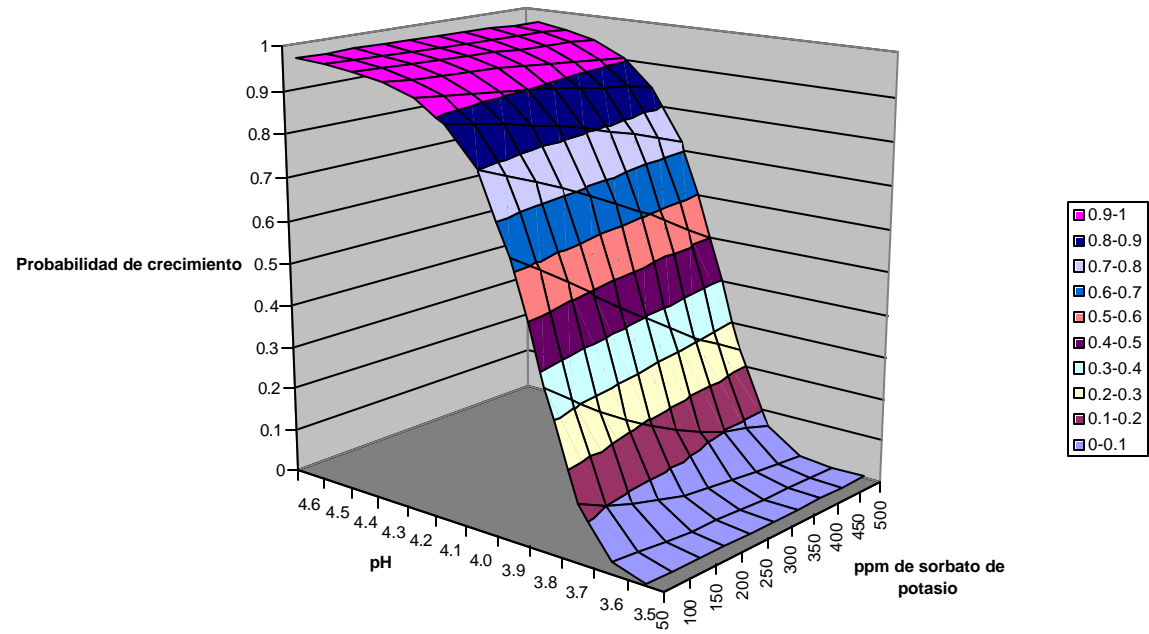
2.4.37 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando NaCl como soluto.

E. coli aw 0.98 con NaCl



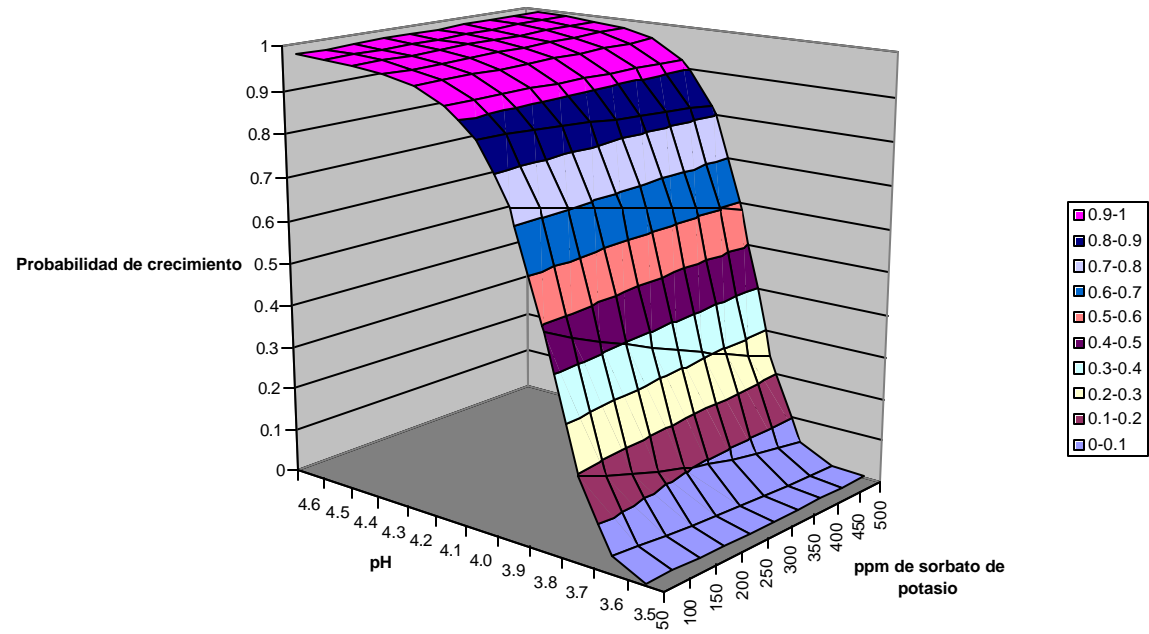
2.4.38 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando NaCl como soluto.

E. coli a_w 0.97 con NaCl



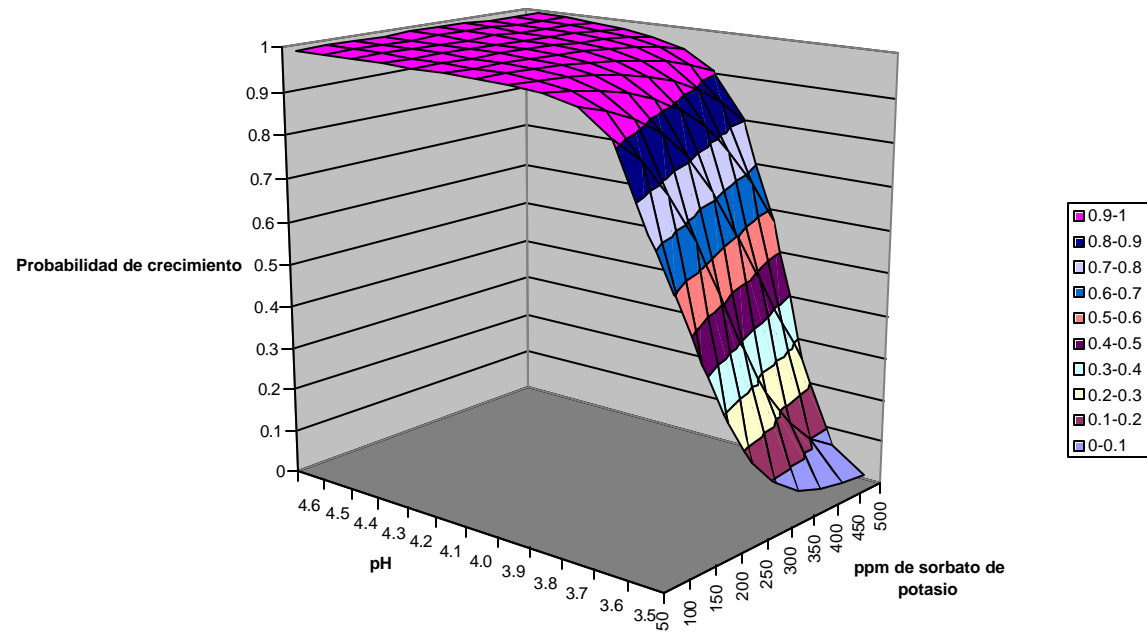
2.4.39 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando NaCl como soluto.

E. coli aw 0.96 con NaCl



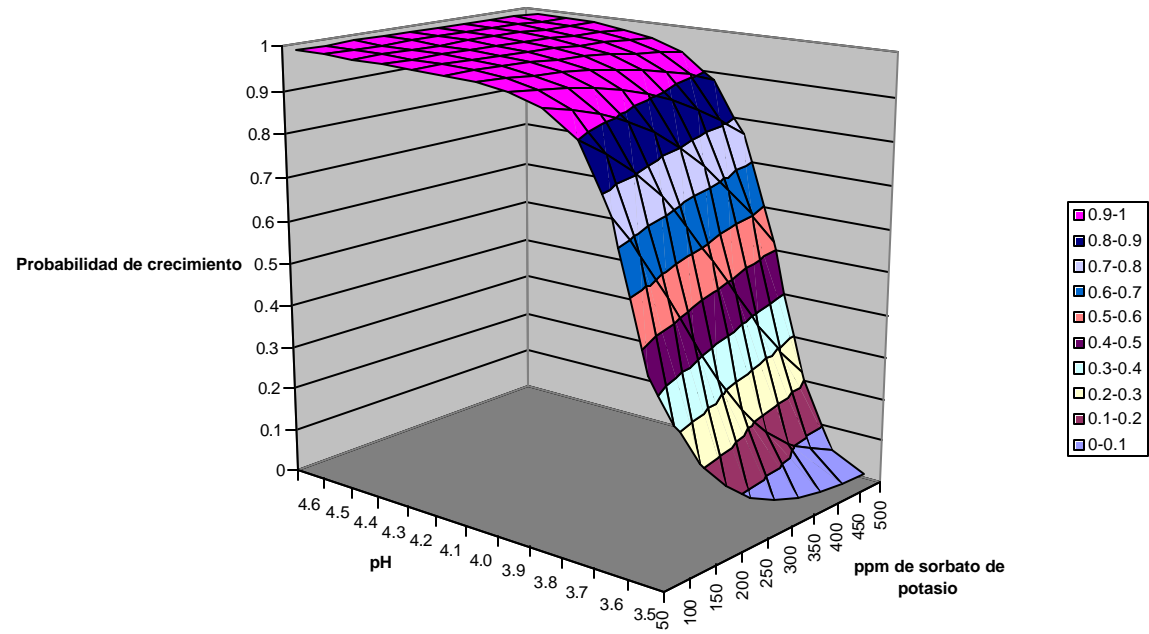
2.4.40 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando NaCl como soluto.

E. coli aw 0.99 con Sacarosa



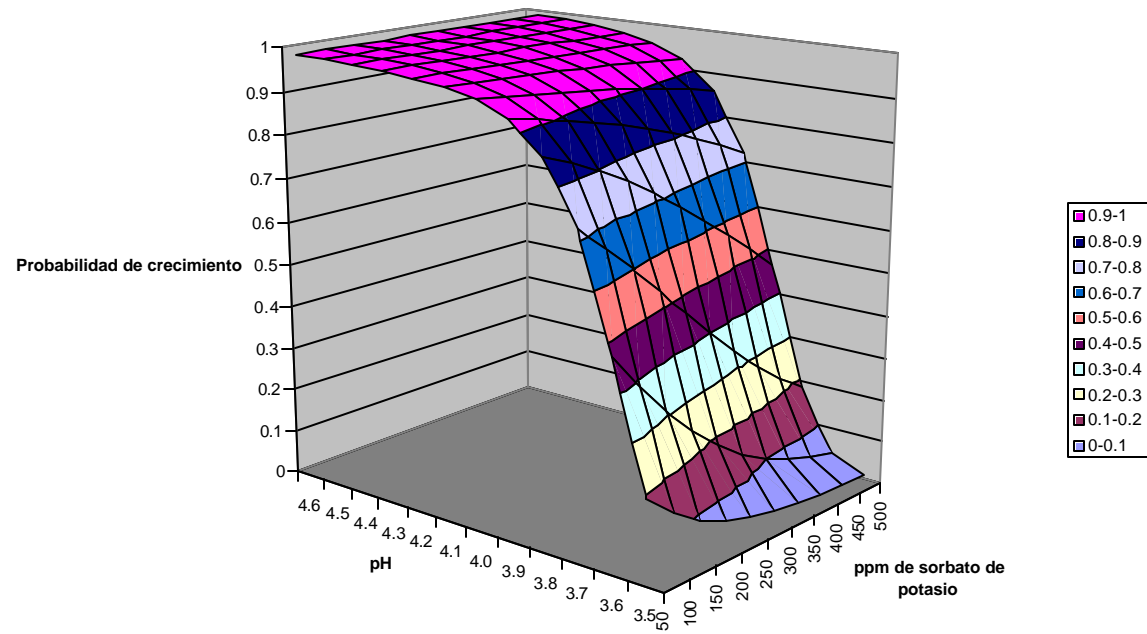
2.4.41 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Sacarosa como soluto.

E. coli a_w 0.98 con Sacarosa



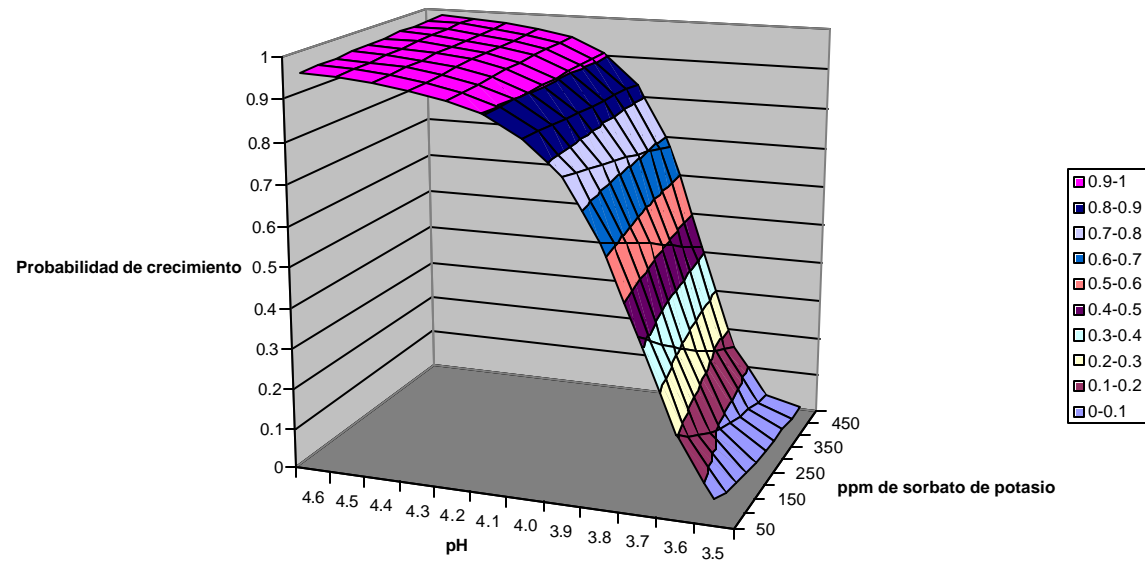
2.4.42 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Sacarosa como soluto.

E. coli aw 0.97 con Sacarosa



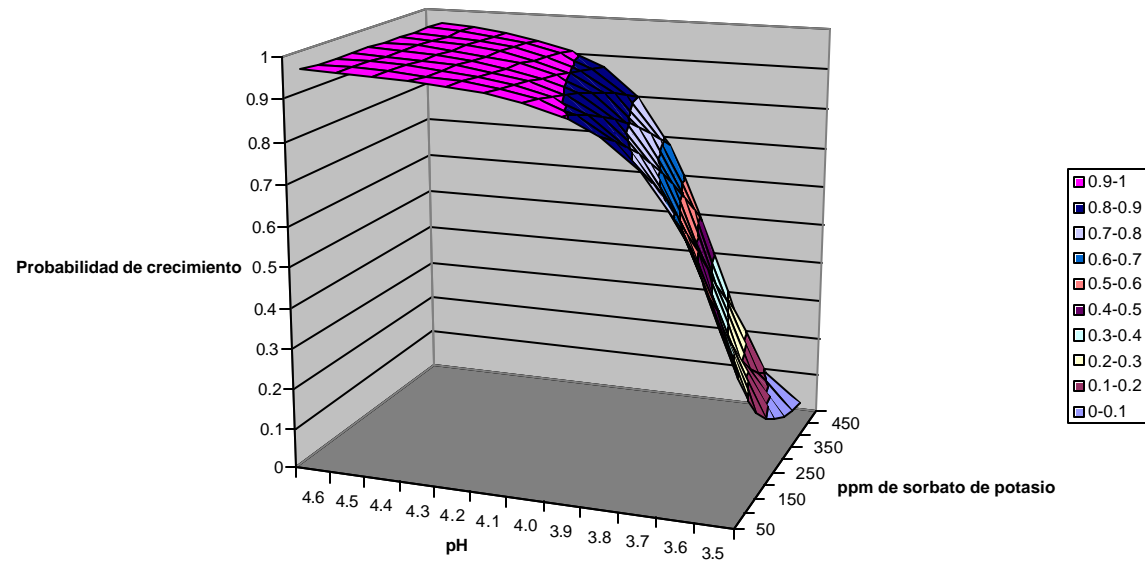
2.4.43 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Sacarosa como soluto.

E. coli aw 0.96 con sacarosa



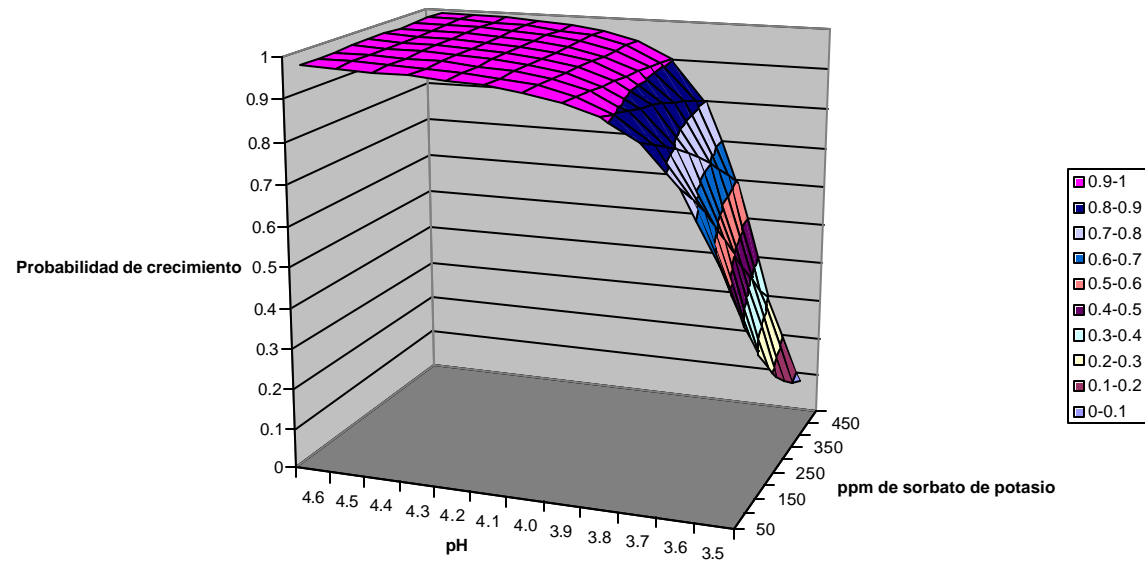
2.4.44 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Sacarosa como soluto.

E. coli aw 0.99 con glicerol



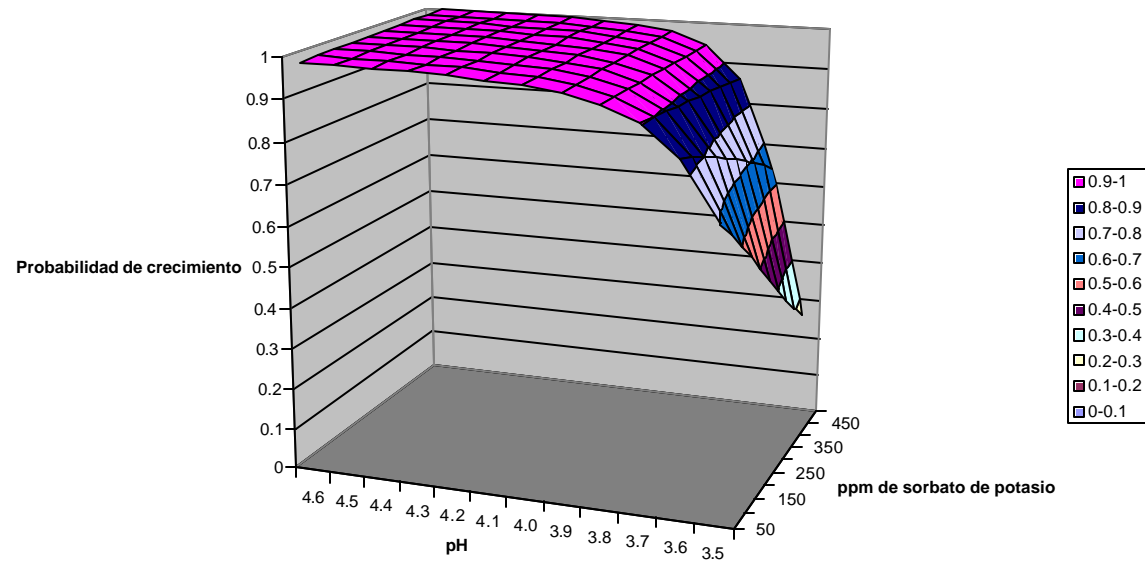
2.4.45 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.99 usando Glicerol como soluto.

E. coli aw 0.98 con glicerol



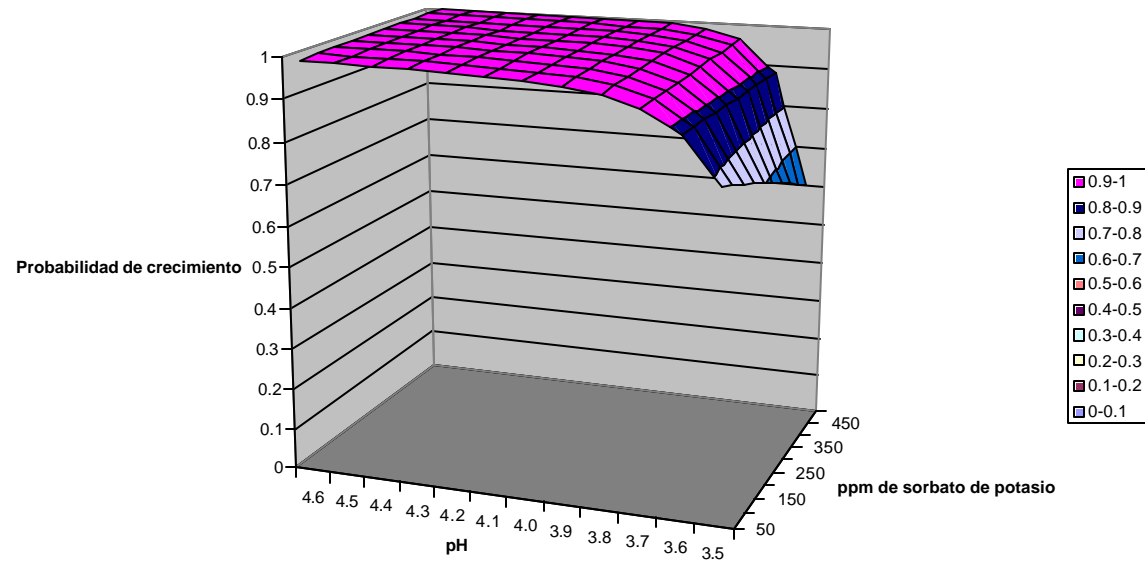
2.4.46 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.98 usando Glicerol como soluto.

E. coli aw 0.97 con glicerol



2.4.47 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.97 usando Glicerol como soluto.

E. coli aw 0.96 con glicerol



2.4.48 Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH en la probabilidad de crecimiento de *Escherichia coli* en agar CASOY formulado con a_w 0.96 usando Glicerol como soluto.

1.5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La adición de cloruro de sodio, sacarosa y glicerol, modifican la acción antimicrobiana del sorbato de potasio para inhibir a *S. aureus*, *L. innocua*, *S. typhimurium*, *E. coli*.
- En términos generales, a mayor concentración de sorbato de potasio, menor probabilidad de crecimiento de las bacterias en estudio.
- *S. aureus*, *L. innocua* y *S. typhimurium* presentaron un comportamiento semejante ante los diferentes valores de a_w , pH, concentración de sorbato de potasio y tipo de soluto. Cuando el valor de a_w es de 0.99 los mejores solutos que promueven el efecto antimicrobiano del sorbato de potasio son NaCl y Glicerol; sin embargo cuando el valor de a_w es de 0.96, la sacarosa es el mejor soluto que promueve la acción antimicrobiana del sorbato de potasio, logrando inhibir a las bacterias estudiadas. Con cloruro de sodio a una a_w de 0.99, se logra disminuir en un 50% la probabilidad de crecimiento de *S. aureus*, a un pH de 4.2 y 450 ppm de sorbato de potasio, así mismo, *L. innocua* en las mismas condiciones pero utilizando glicerol como agente depresor, se logra disminuir en un 50% la probabilidad de crecimiento. *S. typhimurium* a un pH de 4.5 y con 250 ppm de sorbato de potasio, se logra reducir en un 50% la probabilidad de crecimiento de la bacteria si el soluto utilizado es glicerol.
- En el caso de *E. coli* el único soluto que promovió eficazmente el efecto antimicrobiano del sorbato de potasio fue el cloruro de sodio, ya que con sacarosa a una a_w de 0.99, se requiere disminuir el pH a valores de 3.8 y concentraciones de sorbato de potasio mayores a 200 ppm para lograr disminuir en un 50% la probabilidad de crecimiento de la bacteria. Así mismo, glicerol, no es un soluto recomendable cuando se quiere inhibir el crecimiento de *E. coli* por acción del sorbato de potasio, ya que inhibe su efecto antimicrobiano provocando una alta probabilidad de crecimiento, inclusive a valores de a_w y pH bajos (0.96 y 3.6 respectivamente).

- A medida que disminuye el PH, el número de combinaciones de a_w y concentraciones de sorbato de potasio que favorecen la inhibición de los microorganismos es mayor; de tal manera que se disminuye la probabilidad de crecimiento de las bacterias en los medios.
- El NaCl, sacarosa y glicerol utilizados como agentes depresores de la actividad de agua, no afectan significativamente la constante de disociación (pKa), por lo que no alteran la fracción no disociada del ácido en el medio.
- La regresión logística utilizada en este trabajo, fue un buen modelo para predecir el comportamiento de los microorganismos ante las variables estudiadas.
- Se recomienda hacer predicciones con el modelo, empleando un nivel de probabilidad constante.