5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIA PRIMA

- Néctar de durazno Jumex® de un supermercado de la ciudad de Puebla.
- Sorbato de potasio (Merck, Alemania)
- Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol "DRBC" (Becton Dickinson DIFCO, EE.UU.)
- Agar papa-dextrosa "PDA" (Merck, Alemania)
- Cepas de *A. flavus* y *A. niger* (Cepario del laboratorio de microbiología de la UDLAP, México)

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Producción de las esporas de los mohos

Se sembraron cepas de *A. flavus* y *A. niger* del cepario de la Universidad de las Américas Puebla, en cuña con agar papa-dextrosa. Se incubarán a 25°C.

5.2.2 Caracterización del néctar de durazno

pH. Para medir el pH se utilizó un potenciómetro digital (Conductronic pH120, EE.UU) calibrado previamente con buffer de pH 4 y otro de pH 7. Las mediciones se harán por triplicado por inmersión directa del electrodo (San Martín, 2003).

Sólidos solubles (°Brix). Para determinar los sólidos solubles del néctar se utilizó un refractómetro digital (PR-1, Atago, EE.UU) previamente estandarizado con agua destilada. Las mediciones se harán por triplicado (García, 2004).

Acidez titulable. Se colocaron 5 mL de muestra y se añadieron 2 gotas de fenolftaleína como indicador. Después se hizo la titulación con NaOH 0.1 N hasta observar el vire de color. La acidez es reportada como % de ácido málico, de

acuerdo al método 22.059 de la A.O.A.C. (1984). El cálculo de acidez titulable se hizo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = \frac{(V_{NaOH})(N_{NaOH})(meq_{ác\ mál})(100)}{V_{muestra}}$$

Donde V_{NaOH} = Volumen de la solución de NaOH utilizado (mL)
N_{NaOH} = Normalidad de la solución de NaOH
$meq_{ác\ mál}$ =Miliequivalentes ácido málico = 0.067 (García, 2004)
$V_{muestra}$ = Volumen de muestra (mL)

Color. Para la determinación de color se tomaron alícuotas de 10ml de muestra y fueron colocadas en un vaso de precipitados para, posteriormente determinar su color empleando un colorímetro (Color Gardner System05, EE.UU), leyendo los parámetros *L*, *a* y *b* en la escala de Hunter; se utilizó el modo de reflectancia, previamente calibrado con la ayuda de la placa negra y el paso completo de la luz (L=100, b=0 y a=0) (García, 2004).

5.2.3 Caracterización de la lámpara de UVC

Se obtuvieron las dimensiones de la lámpara, del tubo de cuarzo que la rodea y del tubo de acero que rodea ambas. Con la información del sistema, se calcularon la intensidad y la dosis teóricas (Mani, 2003).

5.2.4 Tratamiento con UVC

La muestra fue inoculada con 3.2 mL de *A.flavus* por litro de muestra o con 1 mL de *A. niger* por litro de muestra (inóculo inicial del orden de 10^6 esporas/mL).

La muestra inoculada fue depositada en un vaso refrigerante de doble pared de 1 L, previamente esterilizado, con un agitador magnético. El vaso fue conectado a un baño (Polystat 1268-24, México) con circulación de agua para mantener la temperatura a 25 °C (Fig.6). Se introdujeron las mangueras que conectan la entrada y salida del esterilizador UV en el vaso para hacer recircular la muestra con la bomba peristáltica (MasterFlex 7553-71, EE.UU.) a la velocidad número siete que equivale a un flujo de 1.36L/min (Fig.7).

Figura 6. Baño termostático

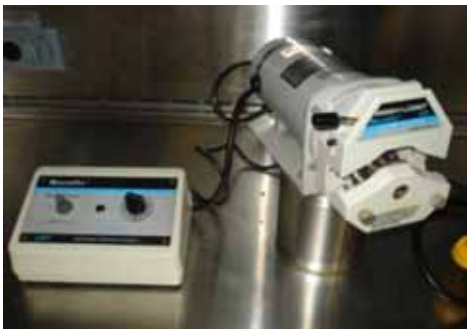

Figura 7. Bomba peristáltica

Figura 8. Lámparas UVC

Se tomaron muestras de 1 mL de jugo a diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 60 minutos de tratamiento). El volumen total ocupado fue de 2.5 L por corrida (un litro por lámpara y 500mL en el vaso de doble pared y mangueras).

Se emplearon dos lámparas de radiación ultravioleta (Light Sources G37T6VH, EE.UU) de 80 cm de longitud y diámetro de 1.5 cm (ver figura 8), con una potencia de 40 W (Light Sources, 2009). Cada lámpara está cubierta por un tubo de cuarzo para permitir el paso de la radiación al líquido, y a su vez están cubiertas por un tubo de acero inoxidable. El sistema de tratamiento con UVC se muestra en la figura 9, resaltando los equipos importantes.

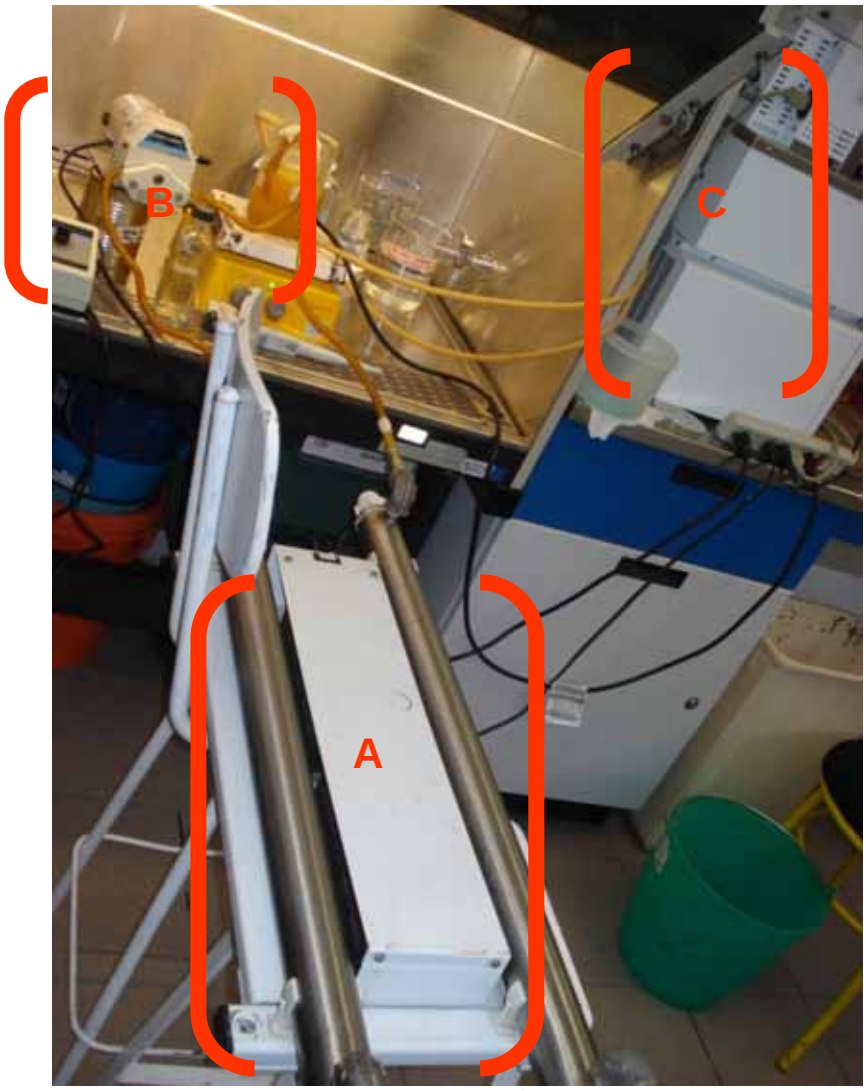

Figura 9. Sistema de radiación UVC (UDLAP)*
*donde A son las dos lámparas de radiación UVC, B es el sistema del vaso de doble pared y la bomba peristáltica y C es el baño termostático

Las alícuotas obtenidas se sembraron en cajas Petri con agar DRBC por extensión en superficie y se incubaron a 25°C para hacer el conteo de esporas después de 5 a 7 días para determinar las cinéticas de inactivación de ambos mohos.

5.2.5 Tratamiento con sorbato de potasio

Frascos previamente esterilizados fueron llenados con 100 mL de néctar, el cual fue inoculado con la misma concentración de *A. flavus* o *A. niger* que con UVC y se les añadió la concentración de sorbato de potasio determinada (0, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm). Se tomaron alícuotas de 1mL de cada sistema y se

sembraron en agar RDBC para después incubarse a 25°C y hacer el conteo de esporas después de 5 a 7 días y determinar las cinéticas de inactivación de cada moho.

5.2.6 Tratamiento combinado

Se utilizó el sistema de UVC con muestras inoculadas con *A. flavus* o *A. niger* en la misma relación descrita anteriormente y con sorbato de potasio en diferentes concentraciones (0, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm). Se obtuvieron alícuotas de 1 mL a los mismos intervalos de tiempo de UVC (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 60 minutos de tratamiento), las cuales fueron sembradas en agar DRBC e incubadas a 25 °C para hacer el conteo de esporas después de 5 a 7 días y determinar las cinéticas de inactivación de cada corrida.

Todos los tratamientos se hicieron por duplicado.

5.2.7 Conteo de esporas

Las muestras de cada tratamiento fueron inoculadas con el método de siembra por extensión en superficie, por duplicado y en cajas Petri con agar DRBC, para después incubarlas a una temperatura de 25°C y hacer el conteo de las esporas después de 5 a 7 días.

5.2.8 Modelación de resultados

Se determinaron las curvas de inactivación de cada uno de los microorganismos estudiados con cada tratamiento y se escogieron las que muestren pendiente negativa (mejor inactivación de las esporas de cada microorganismo). Se realizó el modelado matemático de estas curvas de inactivación utilizando el modelo de Weibull y ajustando los datos de cada curva a la forma acumulativa de la distribución de resistencias de Weibull, cuyo modelo es:

$$\log S_{(t)} = - b\, t^{n} \qquad \text{(Ec. 1)}$$

donde
$S_{(t)} = N / N_0$
N: población al tiempo t
N_0: población inicial
b y n son constantes

(Peleg y Cole, 1998)

Se determinaron los valores de *b* y *n* que mostraron el menor valor de error, utilizando una hoja de cálculo. A partir de estos parámetros, se determinaron los factores de sesgo y de exactitud para corroborar el uso de cada tratamiento por medio de las siguientes ecuaciones (Ross, 1996):

$$\text{Factor de sesgo} = 10^{\frac{\sum \log\left(\frac{valor_predicho}{valor_observado}\right)}{n}} \qquad \text{(Ec. 6)}$$

$$\text{Factor de exactitud} = 10^{\frac{\sum \left|\log\left(\frac{valor_predicho}{valor_observado}\right)\right|}{n}} \qquad \text{(Ec. 7)}$$

Donde se toman en cuenta el logaritmo base diez de los valores predichos divididos entre los observados, donde el valor predicho es el determinado por medio del modelo Weibull y el observado es el experimental. Entre más cercano a la unidad sea el valor de los factores, mejor será el ajuste del modelo a la experimentación.

5.2.9 Comparación de tratamientos

A partir de las curvas de inactivación y la modelación, se hicieron comparaciones entre los tratamientos con UVC y con sorbato de potasio, individualmente y en combinación, haciendo la discusión determinada.

5.2.10 Propuesta de condiciones de tratamiento combinado

De acuerdo a la comparación entre los métodos de conservación y utilizando las predicciones de los modelos que arrojen máxima reducción de esporas de *A. flavus* y *A. niger*, se dio la propuesta de las mejores condiciones para el tratamiento de néctar de durazno. Se hizo la comprobación de estas condiciones propuestas y el estudio de la calidad microbiana y de las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez, °Bx y color) del néctar final almacenado a 5 y 25°C por 7 días. Unas muestras fueron cubiertas y otras no para observar el efecto de la foto-reactivación y comparar con el néctar original.