



DISEÑADORES
DE FRAGANCIAS
Y SABORES



MANE
FRAGANCIAS • SABORES

Oficinas

Emilio Carranza N° 440
Col. El Retoño
C.P. 09440 México, D.F.
Tels: (52 55) 55.32.75.31

Planta

Nemesio Diez Riega N° 9
Parque Industrial El Cerrillo II
C.P. 52050 Lerma de Villada
Estado de México
Tel: 01(728) 282.27.60



Eliminación de Esporas Termorresistentes con Filtros: Implicaciones del Uso de Filtros en la Producción de Refrescos

Atsushi Sakuraoka¹ y Lisa M. Madsen²

Algunos tipos de microorganismos, que impactan negativamente la calidad de los refrescos, forman esporas que cuando son expuestas a un ambiente rico en nutrientes, germinan a células vegetativas y reanudan la propagación.



Foto: Anuga 2007

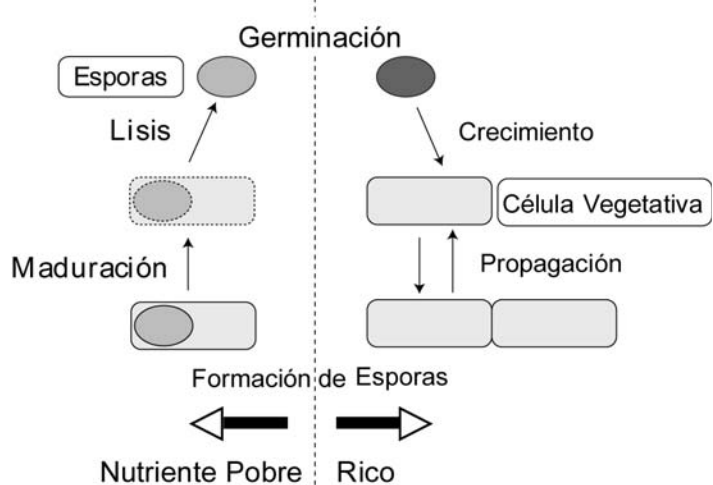
Introducción

Las bebidas no carbonatadas envasadas y selladas en PET, botellas de vidrio o en lata generalmente se esterilizan por calentamiento en el procesamiento para eliminar los microorganismos descomponedores. Las condiciones para una esterilización por calentamiento son estrictas y en algunos casos, dependen del tipo y número de microorganismos en la bebida.

Algunos tipos de microorganismos, que impactan negativamente la calidad de los refrescos, forman esporas cuando los nutrientes en el ambiente se han agotado. Las esporas formadas permanecen latentes hasta que las condiciones ambientales sean favorables para el crecimiento vegetativo. Una vez que las esporas son expuestas a un ambiente rico en nutrientes, germinan a células vegetativas y reanudan la propagación (Figura 1).

Las esporas son altamente resistentes a los factores ambientales físicos y químicos como el calor, UV, radiación y pH extremos (ácidos y alcali). Es difícil por tanto, eliminarlas completamente con técnicas convencionales de tratamiento térmico. Por ejemplo, un tratamiento térmico a 121°C es efectivo, durante varios segundos, para disminuir la supervivencia de las células vegetativas de *B. stearothermophilus* a $<1/10^5$. Para esporas de *B. stearothermophilus*, la duración del tratamiento térmico necesita aumentarse a > 10 -20 minutos para tener el mismo efecto.

Figura 1. Ciclo de vida de una espora que se convierte en microorganismos.



Se requiere extender el tratamiento térmico para eliminar las esporas. Sin embargo, un tratamiento térmico severo altera el gusto, color, sabor y textura de los refrescos, lo que afecta negativamente su valor comercial.

Recientemente se reportó un nuevo tipo de descomposición en bebidas carbonatadas ácidas con jugo de manzana, la cual fue provocada por la presencia de esporas acidófilas termorresistentes. Las bebidas carbonatadas ácidas se tratan térmicamente bajo condiciones relativamente suaves con el fin de mantener su valor comercial. Dicho tratamiento térmico suave, sin embargo, no es efectivo para eliminar las esporas acidófilas termorresistentes. El producto final proporciona un ambiente rico en nutrientes, por esto, las esporas sobrevivientes al tratamiento térmico germinan y se propagan.

¹Departamento Científico y de Servicios de Laboratorio Nihon Pall Ltd., Ibaragi, Japón

²Departamento Científico y de Servicios de Laboratorio, Pall Corporation, Port Washington, Nueva York, EUA.

Los filtros se han utilizado por muchos años en varias etapas del proceso de plantas procesadoras de alimentos. Sin embargo en promedio, la filtración para el control microbiológico en la industria de procesamiento de alimentos, no se utiliza comúnmente a excepción de la industria cervecera, del vino y para la producción de agua mineral. Esto es debido a que los filtros para esterilizar con tamaños de poro de 0.2/0.22µm, que se han utilizado en procesos farmacéuticos para eliminar microorganismos, no solo eliminan los microorganismos sino también podrían eliminar ingredientes esenciales de los refrescos.

Se han investigado filtros que tienen tamaños de poro un poco más grandes que los filtros para esterilizar para evaluar su eficiencia en la eliminación de esporas termorresistentes. La filtración ofrece múltiples ventajas incluyendo: minimización del tratamiento térmico de productos terminados; alteración limitada de sabor e ingredientes; ahorro de energía y reducción de costos en la fabricación de refrescos.

Materiales y Métodos

Membranas para filtrar

En este estudio se utilizaron como membranas de prueba: Supor® EB (EB), Fluorodyne® DB (DB), Supor® EK (EK) and Supor® 800 (SCW800) membranas (Pall Corporation, East Hills, NY). Se utilizó la membrana Fluorodyne® DFL (DFL) de 0.2µm como membrana de recuperación para medir la cuenta de esporas filtradas cuando se utilizaron las membranas de prueba con esporas. Todas las membranas utilizadas en el estudio eran discos de 47 mm.

Esporas analizadas

En este estudio se analizaron las esporas de *B. subtilis* (IAM1026), *B. stearothermophilus* (IAM1035), *B. coagulans* (IAM1115), *C. thermosaccharolyticum* (aisladas de arroz con pollo enlatado descompuesto), *C. Thermacetivum* (aislado de café con leche enlatado descompuesto) y *A. Acodpterrestris* (DSM2498). Todas las cepas utilizadas en el estudio fueron proporcionadas por la *Japan Canners Association*.

La purificación de esporas se realizó en la *Japan Canners Association*. Primero, las cepas bacterianas se cultivaron en un medio de esporulación. Se hizo un frotis de la superficie del medio para obtener las cepas bacterianas. Las cepas bacterianas se inocularon en 10 a 15 ml de agua desionizada fría. Se repitió

un tratamiento ultrasónico de 15 segundos en cada solución de esporas a baja temperatura por cuatro a seis ciclos. Después de ser centrifugados, los gránulos se agregaron a una solución buffer de fosfato de 5mM (pH:8.0). Después se añadió 100µg de lisozima a cada suspensión de 1 ml con espóra y se incubaron por 15 a 30 minutos a 20°C. Cada suspensión se examinó con un microscopio de contraste de fases para determinar si la suspensión de esporas se había contaminado y se la suspensión se había monodispersado. Las suspensiones se congelaron y se enviaron al laboratorio Pall Corporation's Scientific and Laboratory Services Departmente en Nihon Pall Ltd.

En el laboratorio, se filtró la solución buffer 0.067M (pH : 7.0) con una membrana DFL 0.2µm. Para preparar la solución a analizar, cada suspensión de esporas purificada se suspendió en solución buffer de fosfato 0.067M y se aforó a un volumen de 1000ml para tener una concentración de aproximadamente 10⁵ ufc/ml.

Procedimiento

Todas las pruebas se realizaron en una campana de flujo laminar. Las membranas evaluadas (EB, DB, EK y SCW800), membrana de recuperación (CDL), porta disco de 47mm, tubo de silicón y cristalería se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos.

Se preparó una membrana prueba y una membrana de recuperación en un porta discos separado y se les humedeció con agua estéril antes de realizar la prueba de integridad. Sólo estos discos que pasaron la prueba de integridad (descrita más adelante) se utilizaron en las etapas subsecuentes. Una alícuota de 100 ml de la solución a analizar se añadió a cada tipo de membrana a una velocidad de flujo de 33 ml/min por medio de una bomba peristáltica y se recolectó el efluente (filtrado) en un recipiente de vidrio estéril. Cada efluente se calentó a una temperatura óptima (80-100°C) para inducir a la germinación de esporas. Después de inducir la germinación de esporas, la temperatura se disminuyó a la temperatura ambiente. Todo el filtrado se filtró por la membrana de recuperación a una velocidad de flujo de 33 ml/min. Cuando se acabó de filtrar, la membrana de recuperación se quitó del porta discos y se colocó en una placa con medio de cultivo y se incubó a una temperatura óptima de crecimiento de (50-60°C). La cuenta de colonias se realizó para determinar la cuenta de esporas en el filtrado.

La cuenta de esporas en la suspensión analizada se determinó de la siguiente manera. Diez ml de la solución prueba se diluyó a 10^4 - 10^6 por duplicado. Estas diluciones se calentaron a la temperatura óptima de cada spora para que germinara. Después cada solución se filtró con una membrana de recuperación y se contaron las esporas después de cultivarlas. Después de completar la prueba, se repitió la prueba de integridad para cada membrana evaluada.

Prueba de Integridad

La prueba de integridad se realizó de acuerdo al procedimiento del Manual de procedimientos Bubble Point Test.¹⁰

Se conectó un tubo de silicón a la salida del portadiscos, en donde las membranas evaluadas y las membranas de recuperación estaban colocadas; la otra terminación del tubo se introdujo en un vaso de precipitados lleno de agua. Se introdujo gradualmente aire comprimido en la entrada del porta discos y se registró la presión del aire comprimido como el punto de burbuja (BP) cuando las burbujas comenzaron a salir por la salida del tubo de silicón en el vaso de precipitados.

Se consideró un filtro aceptable cuando su valor BP era mayor que el valor mínimo del punto de burbuja mostrado en la Tabla 1.

Resultados

La tabla 2 muestra la concentración de esporas para cada membrana evaluada. La Tabla 3 muestra los resultados de las pruebas. Los resultados son representativos de las pruebas múltiples en uno o dos lotes de medio. No se detectaron esporas de los seis tipos de bacterias en las membranas EB y DB, las cuales tuvieron un tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$. Las esporas de *B. subtilis* penetraron la membrana EK (con tamaño de poro $0.65\mu\text{m}$). Las esporas de las seis especies de bacterias analizadas penetraron los filtros SCW800 (tamaño de poro $0.8\mu\text{m}$).

Discusión

Las esporas bacterianas termorresistentes causan graves problemas en la industria de bebidas si no se eliminan completamente con el proceso de pasteurización convencional. Una posible solución a este problema puede ser la aplicación de filtros para control microbiano con tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$. Este estudio demuestra que los filtros Pall $0.45\mu\text{m}$

son efectivos para eliminar completamente esporas bacterianas termorresistentes.

Varios fabricantes de refrescos actualmente tienen como objetivo reducir la cuenta microbiana a $> 10^5$ ufc/ml. El nivel de biocarga en el proceso de fabricación de refrescos raramente excede 10^5 ufc/ml. Durante las pruebas con filtros Pall, las esporas se inocularon en una solución a una concentración de 10^5 ufc/ml que corresponde a 10^7 ufc/cm² de área de superficie efectiva. En este sentido, los resultados del estudio simulan el control de biocarga en la industria de bebidas. Los filtros que eliminan bacterias ya se aplican en la industria cervecera que no utilizan un proceso con tratamiento térmico. Estos filtros se colocan corriente arriba del proceso de llenado para eliminar levaduras

Tabla 1. Punto de Burbuja mínimo para cada filtro

Filtro	BP Mínimo (mbar)	BP Mínimo (psi)
Membrana		
DFL	3180	46
DB	1240	18
EB	1240*	18*
EK	1100*	16*
SCW800	1100*	16*

*valores preliminares

Generadores de Ozono

- Desde 250 mg. por hora hasta 28 g. por hora
- Led indicador de funcionamiento
- Indicador de entrada de aire seco
- Operación al vacío o con presión de aire seco
- Fabricados con materiales inertes al ozono
- Accesorios adicionales según requerimientos

Tel. México: (55) 2474-8457
 Tel. Fábrica: (777) 380-0791
 Fax sin costo: 01800-202-3845
 e-mail: info@instapura.com.mx
 Subida a Chalma 2044, Lomas Tetela
 62158, Cuernavaca, Morelos, México
www.instapura.com.mx



instapura
 Agua purificada para siempre

Tabla 2. Concentración de esporas presentes en cada prueba

Tipo de Esporas	Concentración (cfu/ml)
<i>B. subtilis</i>	$3.8 \times 10^4 - 2.5 \times 10^5$
<i>B. stearothermophilus</i>	$1.4 \times 10^4 - 1.0 \times 10^5$
<i>B. coagulans</i>	$3.9 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	3.0×10^4
<i>C. thermaceticum</i>	3.3×10^4
<i>A. acidoterrestis</i>	$6.8 \times 10^4 - 4.0 \times 10^5$

Tabla 3. Resultados de las esporas analizadas: Esterilidad Comercial *

Tipo de Membrana	<i>B. subtilis</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>C. thermosaccharolyticum</i>	<i>A. acidoterrestis</i>
DB	Si	Si	NT*	Si	Si
EB	Si	Si	Si	Si	Si
EK	No (LTR [^])	NT	Si	NT	Si
SCW800	No (LTR)	No (LTR)	No(TR [†])	No (TR)	No(LTR)

≠ no se recuperaron esporas en el filtrado

* no se analizó

[^] reducción limitada en titulación, aproximadamente 1-2 logs

[†] titulación reducida, aproximadamente 4 logs.

y especies de *Lactobacillus*. El agua mineral que no pasa por un tratamiento térmico también utiliza filtros grado estéril antes de envasarla.

Algunos fabricantes de refrescos sin embargo, han adoptado filtros para el control bacteriano. Este estudio presenta un solución novedosa para la industria refresquera. Los filtros Pall con tamaño de poro de 0.45µm generalmente no deterioran el sabor de los refrescos filtrados y pueden controlar eficazmente la biocarga de microorganismos descomponedores.

Cuando se aplican filtros en la fabricación de refrescos para el control microbiológico, hay dos opciones disponibles: una es combinar la esterilización con calor y la filtración para la eliminación de bacterias, y otra es utilizar únicamente filtros para la eliminación de bacterias.

Para aplicar filtros, existen tres opciones:

1) Filtración de la materia prima

Filtros para materias primas (ej. soluciones de azúcar y jugos) para reducir la cuenta bacteriana actual en el proceso de fabricación;

2) Filtración del proceso intermedio

Filtros para el flujo intermedio de las etapas críticas del proceso para impedir que los microorganismos penetren y se propaguen. Por ejemplo, se pueden

considerar filtros en la extracción, etapas de preparación y maduración con el fin de evitar la entrada de bacterias en el producto final.

3) Filtración del producto final

La filtración del producto final justo corriente arriba de la etapa de llenado.

La filtración utilizando filtros Pall de 0.45µm mejora la estabilidad biológica sin exponer los componentes de sabor de los refrescos a una degradación térmica. La claridad visual es un beneficio adicional de estos filtros que son altamente eficaces en eliminar materia suspendida inherente en los subcomponentes del producto, o la que es resultado de adiciones corriente arriba en el proceso o reacciones que generen formación de nebulosidad durante el proceso. Este método está limitado para las bebidas que no se desee que sean turbias por diseño. Este proceso de filtración es un medio para controlar la calidad, mejorar la seguridad y fabricar un producto con características completas de sabor reduciendo los costos en el procesamiento con métodos térmicos de control de biocarga.

Fuente:

Pall Food and Beverage
Scientific & Technical Report
EUA. 2001.

Traducción: I.A. Violeta Morales V

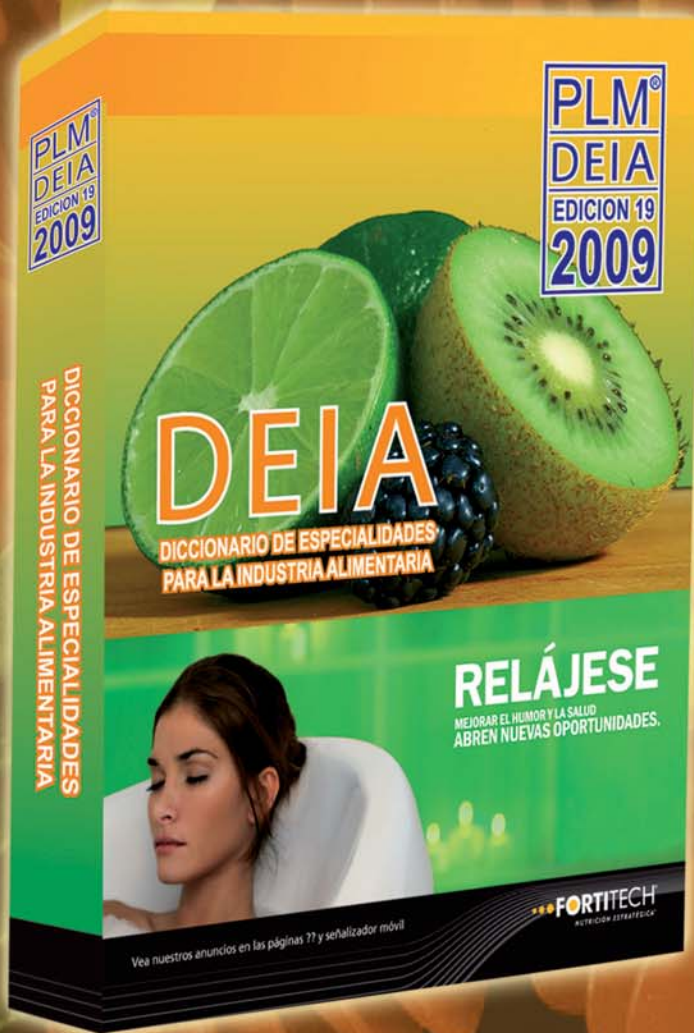
PLM®



Incrementa tus ventas
al máximo

Participa!

18 años
nos respaldan



DEIA

DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES
PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Contacto

Ma. Teresa Fandiño y G.L.

Gerente Unidad de Negocios Área Técnica

Tel: 54807881 / teresa.fandino@plmlatina.com