



Inactivación de microorganismos por homogenización a alta presión

G. G. Amador Espejo* y H. Ruiz-Espinosa

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

La homogenización a alta presión (HAP) ha sido empleada en la industria biotecnológica, farmacéutica y química para la preparación de emulsiones y suspensiones, como mecanismo de lisis celular o para generar cambios físicos en los fluidos procesados. En últimas fechas, ha empezado a explorarse el uso de la HAP como método de conservación en alimentos; con tal fin, se han desarrollado diversas investigaciones para evaluar el nivel de letalidad e identificar los mecanismos de inactivación de diferentes microorganismos, nativos o inoculados, en alimentos fluidos homogenizados a alta presión. Entre los factores de mayor influencia en la HAP se incluyen la presión de operación, temperatura de entrada, número de recirculaciones, tipo de equipo y viscosidad del medio. Las bacterias exhiben resistencia variable la HAP (esporas > vegetativas, Gram(+) > Gram(-), fase estacionaria > fase log), mientras que otros microorganismos han sido estudiados (principalmente hongos y levaduras). Los recientes resultados científicos muestran aplicaciones promisorias de la HAP en la inactivación microbiana, pero aún se requiere investigar más para definir las condiciones del proceso requeridas para crear aplicaciones alternas al tratamiento térmico de alimentos fluidos. El propósito de esta revisión es presentar un panorama general de los trabajos publicados a la fecha sobre la inactivación microbiana mediante HAP. Se hará énfasis en las diferencias de inactivación observadas entre diferentes grupos microbianos y se brindará una perspectiva de posibles aplicaciones de HAP en productos selectos.

Palabras clave: Homogenización a alta presión, inactivación microbiana, tecnologías no térmicas.

Abstract

The high pressure homogenization process (HPH) has been frequently employed in the biotechnological, pharmaceutical and chemical industry to prepare emulsions and suspensions, as a cellular lysis mechanism, or to generate physical changes in processed fluids. Recently, the use of HPH has been explored as a preservation method in food systems; with this aim, several research projects have been developed to evaluate the lethality level reached and identify the inactivation mechanisms of the different microorganisms (native or inoculated) in fluid products treated by HPH. Some factors with major relevance in the microorganism inactivation are: operating pressure, inlet temperature, fluid recirculation, equipment used and fluid viscosity. Bacteria exhibit variable resistance (spores > vegetative, Gram(+) > Gram(-), stationary phase > log phase) while other microorganisms have been analyzed (mainly yeasts and molds). Recently, published results show promising applications of HPH in microbial inactivation, but further research is needed in order to determine the processing parameters required to create alternate thermal processing. The purpose of this review is to present an up to date general overview of published results on microbial inactivation using HPH. Inactivation differences observed between different microbial groups will be emphasized and possible applications of HPH on selected products will be discussed.

Keywords: High pressure homogenization, microbial inactivation, non-thermal technologies.

* Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: yaotl14@yahoo.com.mx

Introducción

Dentro de las tecnologías no térmicas para el procesamiento de alimentos, una de las opciones más promisorias es la homogenización a alta presión (HAP). Aunque su funcionamiento es similar al de un homogenizador convencional, el equipo de HAP destaca por el intervalo de presiones al que opera (50-400 MPa), lo cual permite no sólo cambiar las características de estabilidad coloidal de los líquidos procesados, sino modificar su estructura, funcionalidad y carga microbiana (Bríñez *et al.*, 2006; Palou *et al.*, 1999).

Aún cuando sus aplicaciones biotecnológicas (para la ruptura y vaciado del contenido celular) se conocen desde hace mucho tiempo, su uso en alimentos es reciente. A la fecha se ha estudiado en diversos sistemas modelo y productos alimenticios como leche, leche de soya, jugos, dispersiones de almidón, etc. con el fin de reducir su carga microbiana inicial. La inactivación microbiana por HAP se ha atribuido a distintos mecanismos, incluyendo cavitación, impactos a alta velocidad y fenómenos de cizalla (Popper y Knorr, 1990; Thiebaud *et al.*, 2003; Diels y Michiels, 2006). Diversos factores intrínsecos (tipo, magnitud y fase de crecimiento de la carga microbiana, matriz alimenticia, temperatura del fluido) y extrínsecos (presión de proceso, número de etapas, número de ciclos, tipo de homogenizador, temperatura de salida) influyen sobre la letalidad microbiana al tratamiento de HAP (Diels y Michiels, 2006; Bríñez *et al.*, 2006; Tahiri *et al.*, 2006; Vachon *et al.*, 2002).

Actualmente, sólo ha sido publicada una revisión sobre la utilización potencial de la HAP para la reducción de la carga microbiana inicial en alimentos (Diels y

Michiels, 2006). Esto puede deberse a su reciente aparición -la primera referencia sobre el uso de HAP en alimentos es por Lanciotti *et al.* (1994)- ó bien a la dificultad para establecer parámetros de proceso únicos que generen resultados reproducibles, debido a la diversidad de equipos de HAP disponibles y a diferencias de operación entre los mismos, principalmente en términos de generación y mantenimiento de presión.

El objetivo de la siguiente revisión es proporcionar una perspectiva general de los avances en el uso de la HAP como una tecnología alterna de conservación de alimentos fluidos, basado en la información publicada en años recientes. Adicionalmente, las tendencias a futuro en esta área serán también discutidas. Para facilitar su completa comprensión, este artículo incluye una descripción del mecanismo de acción de la tecnología de HAP, la cual abarca las diferencias entre los dispositivos de alta presión y los productos en los cuales ha sido aplicada.

Revisión bibliográfica

Equipos empleados en la homogenización a alta presión

La homogenización es un proceso estándar en la industria láctea. Desde su aparición a principios del siglo XX, ha tenido grandes avances; los últimos se basan en el desarrollo de materiales para la fabricación de válvulas con mayor resistencia mecánica, con el fin de aumentar el nivel de presión empleada (Thiebaud *et al.*, 2003; Fluory *et al.*, 2000).

En años recientes, se han desarrollado distintos equipos que pueden alcanzar presiones por arriba de los 100 MPa, que de

manera genérica, son conocidos como homogenizadores a alta presión. Schultz *et al.* (2004) subdividen estos sistemas en difusores radiales, dispersadores de contrapropulsión (de jet), y agregados de boquilla axial, dependiendo de la dirección del flujo. Algunos modelos comerciales son descritos por Paquin (1999), incluyendo el homogenizador de jet Nanojet de la compañía Haskel (Haskel Internacional Inc. CA, EUA), empleado para preparar emulsiones, los cuales actualmente cuentan con capacidad de hasta 30 L/h y 200 MPa; el microfluidizador de la marca Microfluidics (Microfluidics Inc. MA, EUA), cuyo principio de operación se basa en la separación de una corriente de líquido en dos microcorrientes que posteriormente se recombinan por colisión en una cámara y posee versiones para procesamiento industrial de alrededor de 275 MPa (Feijoo *et al.*, 1997); y el Emulsiflex, de la compañía Avestin, el único que funciona como un homogenizador estándar y alcanza presiones de hasta 300 MPa. Actualmente otras compañías como DeBee (Bee International Inc, MA, EUA) y Niro Soavi (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) fabrican homogenizadores industriales de alta presión, con presiones de operación que alcanzan los 150 MPa y 310 MPa y flujos de hasta 3000 y 3750 L/h, respectivamente. Sin embargo los homogenizadores de la compañía Stansted Fluid Power (Essex, Inglaterra), cuyos modelos más recientes pueden desarrollar presiones de hasta 400 MPa, son los más empleados en los reportes disponibles en la bibliografía.

En general, todos los equipos antes mencionados se emplean en la industria farmacéutica, cosmética, biotecnológica y alimenticia en diversas aplicaciones, incluyendo la ruptura celular (para liberación de contenidos celulares), formación de microemulsiones y nanopartículas, estabilización de suspensiones e inactivación

microbiana para la conservación de los alimentos (Semo *et al.*, 2007; Diels y Michiels, 2006; Fluory *et al.*, 2000; Paquin, 1999).

Salvo en los homogenizadores de las marcas Haskel y Microfluidics, un homogenizador de alta presión opera de manera similar a un homogenizador convencional; consiste de un generador de alta presión, acoplado a una válvula fabricada con materiales de alta resistencia (acorde con la intensidad del proceso), a través de cuyo asiento se hace pasar el fluido a presurizar. Los mismos fenómenos que propician la reducción del tamaño de la fase dispersa de emulsiones en los homogenizadores convencionales (turbulencia, cizalla, cavitación e impacto) se presentan, aunque a intensidades considerablemente mayores, y producen sistemas coloidales muy finos y estables, con menor dispersión de tamaño y diámetros < 0.3-0.4 μm ; induciendo cambios adicionales en el producto tratado como inactivación microbiana y enzimática aún a temperaturas moderadas de operación (40-50°C); inactivación de bacteriófagos, modificación de las propiedades reológicas de fluidos y alteración de la funcionalidad de productos elaborados con los fluidos presurizados (Briñez, 2006; Popper y Knorr, 1990). Una representación esquemática básica de la sección de alta presión de un homogenizador Stansted FPG7400H:350 se presenta en la Figura 1 (Thiebaud *et al.*, 2003). Este equipo opera a presiones de hasta 350 MPa y utiliza un intensificador de 80 mL de capacidad útil (1), impulsado por una bomba hidráulica (2); el ciclo de operación se lleva a cabo en dos etapas: llenado del intensificador (aprox. 9 s) y aumento de presión y descarga del intensificador (10 s); la velocidad de flujo depende de la presión de operación y va de los 13.6 L/h a 300 MPa hasta 16 L/h a 100 MPa. Otros homogenizadores trabajan con dos intensificadores, así que cada ciclo se

repite con cada intensificador, existiendo cierto tiempo de traslape, establecido para mantener estable el nivel de presión de homogenización y estimado como 1 s por cada 100 de presión, en MPa (Freeman, 2007). El líquido presurizado pasa entonces a la válvula de alta presión (3), para ser inmediatamente enfriado en un intercambiador de calor de espiral (4). Este intercambio de calor es necesario, pues la intensidad a la que se presentan las fuerzas de homogenización ocasiona una elevación de la temperatura del fluido; en leche, se ha determinado que este incremento varía con la presión de operación y la temperatura de alimentación. Datta *et al.* (2005), estimaron un aumento en la temperatura a la salida de la válvula era de $0.5887^{\circ}\text{C}/^{\circ}\text{C}$ de la temperatura de entrada. Fluory *et al.* (2000), observaron un incremento de temperatura en emulsiones modelo aceite en agua de 46°C al

aumentar el nivel de presión de 20 a 300 MPa, atribuyendo este calentamiento al esfuerzo de deformación debido a la alta

velocidad del flujo. Al igual que en el proceso tradicional, los equipos *Stansted* permiten ser configurados con una segunda etapa de homogenización, impulsada por una bomba neumática (SFP, 2005) la cual, si se coloca, permite trabajar de 1/3 a 1/10 de la magnitud de presión de la primera etapa, sin exceder los 40 MPa (Serra *et al.*, 2007; Picart *et al.*, 2006). Al igual que en una homogenización convencional, esta segunda etapa permite el rompimiento de aglomeraciones de glóbulos grasos y otras partículas e incrementa la estabilidad coloidal del producto.

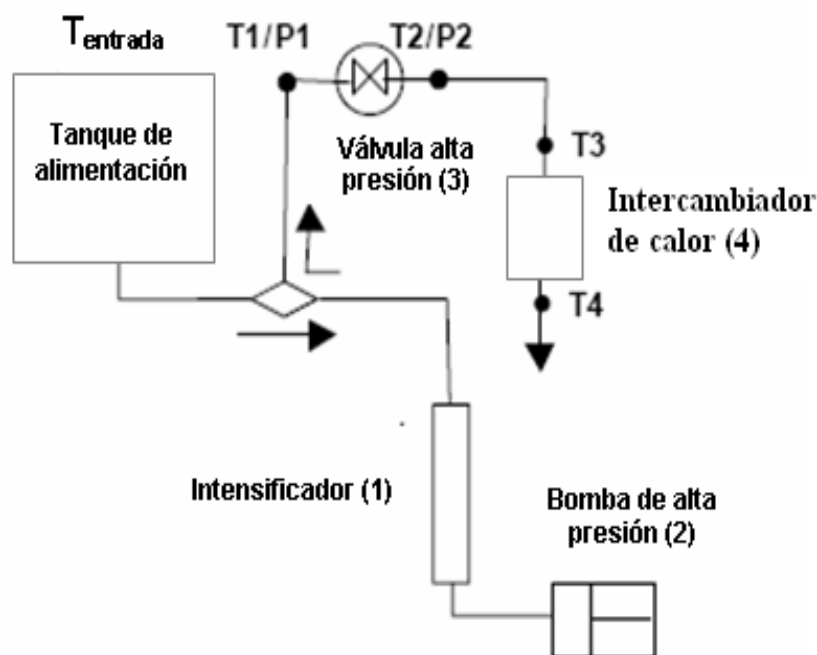


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un homogenizador *Stansted* con un solo intensificador. T1/P1: Sensor de temperatura y presión del fluido antes de la homogenización. T2/P2: Sensor a la salida de la válvula. T3, T4: Sensores de temperatura antes y después del enfriamiento del fluido. Adaptado de Thiebaud *et al.* (2003).

Efecto de la HAP sobre la carga microbiana

Los mecanismos de inactivación microbiana asociados a la HAP no han podido ser

esclarecidos completamente, aunque se piensa que son múltiples y que interactúan entre sí. Diels y Michiels (2006), enumeran los principales mecanismos propuestos a la fecha: gradientes de presión y velocidad dentro del fluido, turbulencia, cavitación (y formación de radicales libres relacionados con este fenómeno), impacto con superficies sólidas y esfuerzo extensional. Cambios en la morfología celular, lesiones en la membrana citoplásmica, incrementos súbitos en la permeabilidad y ruptura de la membrana celular (con el consecuente vaciado de contenido celular) se han reportado como causas de muerte celular a causa de la HAP y se han observado por microscopía electrónica de transmisión (Geciova *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002). El impacto de la HAP varía con el grupo de microorganismos estudiado; las diferencias observadas se detallan a continuación.

Bacterias. Se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la eficacia del tratamiento HAP en la inactivación de bacterias y el posible efecto de la matriz alimenticia sobre el número de ciclos logarítmicos de reducción logrados. Dentro de los fluidos alimenticios más utilizados como medio para evaluar la efectividad de la HAP se encuentran la leche, jugo de naranja, leche de soya, y diversos sistemas modelo (Lanciotti *et al.*, 1994; 1996; 2004; Diels *et al.*, 2003; Briñez, 2006; Smiddy *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2007; Capra *et al.*, 2009).

Dentro de los grupos de bacterias más estudiadas se encuentran principalmente las patógenas (Lanciotti *et al.*, 1994; 1996; Feijoo *et al.*, 1997; Wuytack *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003; 2005;

Hayes *et al.*, 2005; Briñez *et al.*, 2006; Tahiri *et al.*, 2006; Smiddy *et al.*, 2007; Chavez-Lopez *et al.*, 2009). Algunos de los parámetros evaluados incluyen: nivel de inactivación a distintos intervalos de presión (100-300MPa), temperatura de entrada (5-70°C), número de ciclos del homogenizador (uno y dos ciclos), el número de recirculaciones y el efecto de distintos parámetros fisicoquímicos (pH y a_w). Se ha mostrado una marcada diferencia entre el nivel de reducción alcanzado en bacterias del tipo Gram (+) con respecto a las Gram (-). Esta diferencia en el nivel de inactivación alcanzado se debe principalmente a la constitución de la pared celular, que en bacterias Gram (+) es más rígida, ya que esta compuesta de peptidoglucanos, los cuales resisten mejor los procesos de disrupción celular del tipo mecánico (Geciova *et al.*, 2002).

Bacterias Gram (+). Dentro de las más relevantes, se han estudiado *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Bacillus licheniformis*, *B. cereus* y *Enterococcus faecalis*. Estos microorganismos presentan una alta resistencia al tratamiento HAP; por otra parte, el incremento de temperatura y la reducción del pH y la a_w no aparentan ofrecer un efecto sinérgico para la inactivación de este tipo de microorganismos (Hayes *et al.*, 2005; Diels *et al.*, 2003; Lanciotti *et al.*, 1996). *Staphylococcus aureus* se ubica a la fecha como el microorganismo patógeno más resistente al tratamiento HAP. Operando bajo condiciones de 200-250 MPa / 55-70°C (Smiddy *et al.*, 2007) y 200 MPa/25°C (Wuytack *et al.*, 2002) se obtuvieron reducciones menores a un ciclo logarítmico para este microorganismo. El incremento de presión y el número de recirculaciones incrementa de manera importante la inactivación. Se ha logrado una reducción de hasta cuatro ciclos logarítmicos usando 300 MPa y temperaturas

en el rango de 20 y 50°C (Briñez, 2006) mientras que cuatro pases a 250 MPa / 45°C lograron una inactivación de 3.5 ciclos logarítmicos (Wuytack *et al.*, 2002).

Otro patógeno frecuentemente empleado en los estudios con HAP es *Listeria monocytogenes* y su subrogado *Listeria innocua* (los cuales han mostrado tener el mismo nivel de resistencia); Kheadr *et al.* (2002) y Briñez (2006), reportan una reducción de 3-4 ciclos logarítmicos en las cuentas del microorganismo a 200 MPa/ 5 pases y 300 MPa/1 pase respectivamente, lo cual demuestra el efecto aditivo del número de recirculaciones sobre la letalidad del proceso. La reducción de *L. monocytogenes* por HAP se ve influenciada por la temperatura de alimentación del fluido. Lanciotti *et al.* (1994, 1996) lograron reducciones de cuatro y siete ciclos logarítmicos con 150 MPa/37°C y 190 MPa/25°C respectivamente.

La resistencia de las esporas de bacterias Gram (+) a la HAP es mayor que la exhibida por las células vegetativas. Lanciotti *et al.* (1994) lograron una reducción de alrededor de 4.5 ciclos logarítmicos de *B. subtilis* con 150MPa/25°C. Mientras tanto, Feijoo *et al.* (1997) y Chaves-López *et al.* (2009), obtuvieron reducciones menores a un ciclo logarítmico de esporas de *B. licheniformis*, *B. cereus*, y *B. subtilis*, con tratamientos de 50-200 MPa/33-50°C; se requirieron tres recirculaciones para alcanzar una reducción comparable en la cuenta de esporas (cinco ciclos logarítmicos). Por otra parte, Bevilacqua *et al.* (2007) lograron reducir 1-1.5 ciclos logarítmicos de células vegetativas y menos de un ciclo de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante 170 MPa/55°C. Asimismo, en este estudio, se mostró que la temperatura, el pH del medio y

la cepa del microorganismo influían en la magnitud de la inactivación.

Algunos microorganismos Gram (+) no patógenos de interés limitado en alimentos han sido investigados. Picart *et al.* (2006), obtuvieron una reducción de 2.5 ciclos logarítmicos en *Micrococcus luteus* a 300MPa/24°C. Por su parte, Briñez (2006), estudió la inactivación de *Staphylococcus carnosus* en leche y jugo de naranja con 300MPa/20°C, logrando una reducción de 3.5 ciclos logarítmicos.

Asimismo, se ha explorado la inactivación de bacterias fermentativas Gram (+), como *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, por medio de HAP, principalmente como parte de la flora nativa de leche y jugo de naranja. Lanciotti *et al.* (2007), empleando 150 MPa/10°C para procesar suspensiones microbianas de diferentes especies de lactobacilos, reportaron magnitudes de inactivación de 0 a 1.5 ciclos logarítmicos. Smiddy *et al.* (2007), lograron disminuciones de 3.5 ciclos logarítmicos en la carga inicial de bacterias fermentativas empleando 200-250 MPa de presión y 55-70°C de temperatura de entrada. Por su parte, Tahiri *et al.* (2006) obtuvieron una disminución de aproximadamente 3.5 ciclos logarítmicos a 200 MPa/25°C en cepas de *Lactobacillus plantarum*; el nivel de inactivación resultante del proceso se elevó a más de seis ciclos logarítmicos cuando se aplicaron 5 pases.

Bacterias Gram (-). Con respecto a este grupo de bacterias, los principales microorganismos evaluados incluyen *E. coli*, (junto con la cepa O157:H7), *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium y *Shigella flexneri* (Lanciotti *et al.*, 1994; 1996; Miller *et al.*, 2002; Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003; 2005; Tahiri *et al.*, 2006; Briñez, 2006).

Para *E. coli* los niveles de presión utilizados se encuentran entre los 100-300 MPa, la temperatura de entrada entre los 6-25°C y el número de recirculaciones (de 1 a 5) (Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2004; 2005; Tahiri *et al.*, 2006; Briñez, 2006). Los resultados obtenidos son similares en todos los estudios realizados, ya que con 200 MPa se logró un nivel de inactivación de alrededor de tres ciclos logarítmicos (Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2005; Tahiri *et al.*, 2006); mostrándose un incremento en la inactivación, al aumentar la presión y recirculaciones. Con 300 MPa se han obtenido hasta 4.5 ciclos logarítmicos de reducción en las cuentas, y alrededor de seis ciclos logarítmicos al realizar cinco recirculaciones (Wuytack *et al.*, 2002; Tahiri *et al.*, 2006; Briñez, 2006). Adicionalmente, algunos factores extrínsecos como el aumento de temperatura y la disminución de la viscosidad relativa de la matriz alimenticia, aumentan el nivel de inactivación del microorganismo (Diels *et al.*, 2005; Briñez, 2006).

La inactivación de *Yersinia enterocolitica* por HAP se ha explorado usando diversos intervalos de presión (100-300 MPa) y temperatura (5-50°C) (Lanciotti *et al.*, 1994; Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003). Reducciones de hasta 3 ciclos logarítmicos se han obtenido con 300 MPa/50°C (Lanciotti *et al.*, 1994; Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003). Por otra parte, *Salmonella typhimurium*, ha probado ser más resistente al tratamiento HAP (250 MPa/25°C, dos ciclos logarítmicos), que *Shigella flexneri* (4.5 ciclos logarítmicos) (Wuytack *et al.*, 2002).

Para el caso de los psicrotrofos, se ha estudiado predominantemente a *Pseudomonas fluorescens*. Los niveles de inactivación de *P. fluorescens* a 200 MPa y diversas temperaturas de entrada (25,55 y 70°C) están en un rango de 3-6 ciclos

logarítmicos (Wuytack *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2005; Picart *et al.*, 2006; Smiddy *et al.*, 2007). Estos datos son contradictorios con los reportados por Thiebaud *et al.* (2003), que utilizando una presión de 200 MPa/25°C, obtienen una inactivación de bacterias psicrotrofas de sólo 1.6 ciclos logarítmicos. Esta diferencia en los datos reportados es debida, en su mayor parte, al uso de la temperatura como un efecto sinérgico en la inactivación.

Las bacterias coliformes han sido evaluadas en diversos estudios. En términos generales, los resultados muestran un aumento en el nivel de inactivación como respuesta al incremento de presión. Wuytack *et al.* (2002), logran una inactivación de alrededor de tres, cuatro y cinco ciclos logarítmicos a 200, 250 y 300 MPa respectivamente, empleando 25°C de temperatura de entrada. Este resultado concuerda con lo reportado por Smiddy *et al.* (2007), que empleando 250 MPa, obtienen un nivel de reducción de cuatro ciclos logarítmicos.

Mohos y levaduras. Dentro de este grupo de microorganismos, se han llevado a cabo contados estudios acerca de su inactivación por medio de HAP, siendo más comunes para las levaduras. Tahiri *et al.* (2006) publicaron el único estudio a la fecha sobre inactivación por HAP. En éste, cepas de *Penicillium spp.* aisladas de jugo de naranja fueron tratadas a presiones de 100, 150 y 200 MPa/25°C y 1, 3 y 5 recirculaciones. Los resultados indican una gran resistencia de los mohos al tratamiento, pues aún con cinco pases el máximo nivel de inactivación fue de 2.2 ciclos logarítmicos.

En cuanto a levaduras, las más estudiadas a la fecha son *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica* debido a sus numerosas aplicaciones industriales. Kleining y Middleberg (1998), llevaron a cabo un

estudio teórico sobre las fuerzas de tensión y su correlación con el número de Reynolds (Re), número de Weber (We) y el número de Aceleración (Ac) en un homogenizador, y cómo éstas pueden provocar la disrupción de levaduras que cumplen con condiciones específicas (ser de pared celular delgada, con forma esférica, rellenas de líquido). A una presión de 56 MPa, se puede lograr la disrupción de la levadura. Por otra parte, Lanciotti *et al.* (1994 y 1996) realizaron estudios sobre el nivel de inactivación de *Y. lipolytica* con presiones en el rango de 40-200 MPa; además, evaluaron el posible efecto sinérgico de barreras adicionales (temperatura, pH, a_w) sobre el nivel de inactivación. Los resultados muestran una reducción de 4.5 ciclos logarítmicos a 200 MPa/25°C. Mayores niveles de inactivación fueron alcanzados al incrementar la temperatura, pero los efectos de pH y a_w no fueron significativos. Tahiri *et al.* (2006) evaluaron el nivel de inactivación de *S. cerevisiae* aislada en jugo de naranja, usando niveles de presión de 100, 150 y 200 MPa/25°C y 1, 3, y 5 recirculaciones. Los niveles de inactivación alcanzados a 200 MPa y una recirculación fueron menores a un ciclo logarítmico, pero con cinco recirculaciones se alcanzó un nivel de inactivación mayor a los dos ciclos logarítmicos.

Virus. Los virus en alimentos han sido poco estudiados, y por ende, los estudios sobre su inactivación por medio de HAP son escasos. Jean *et al.* (2001), estudiaron el uso de HAP para inactivar el virus de la Hepatitis A, reportando una resistencia del virus alta, ya que un ciclo logarítmico de reducción requirió de un proceso a 300MPa con 5 pases.

Otros estudios se han llevado a cabo con la intención de evaluar el uso de HAP como

medio para inactivar bacteriófagos de lactobacilos (debido a su importancia en la industria láctea). Moroni *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio sobre la inactivación de los bacteriófagos de lactococos *c2*, *sk1* y *ul36* inoculados en leche, buffer fosfato y suero de leche filtrado, empleando 100 y 200 MPa/25°C y 1, 3 y 5 recirculaciones en el equipo. Un proceso a 200 MPa y cinco recirculaciones logró un nivel de inactivación de cinco ciclos logarítmicos en buffer y de 2.5-3 en los demás sistemas. Posteriormente, Capra *et al.* (2009), evaluaron el uso de HAP para inactivar bacteriófagos de *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. paracasei* y *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* empleando condiciones similares a las utilizadas por Moroni *et al.* (2002), logrando niveles de inactivación de alrededor de seis ciclos logarítmicos al usar 100 MPa y cinco recirculaciones; en algunos casos, la barorresistencia de los bacteriófagos resultó muy elevada, ya que aún cuando emplearon ocho recirculaciones no lograron reducir completamente la carga inicial del virus (6 log).

Tendencias a futuro

Dentro de las tendencias a futuro en el uso de la tecnología HAP se encuentra su empleo como una etapa del proceso en la elaboración de diversos productos (yogurt, quesos, yogurt de leche de soya, entre otros). Adicionalmente a las ventajas de orden microbiológico, la HAP propicia el desarrollo de propiedades funcionales únicas en los productos antes mencionados, lo cual amplía sus posibilidades de aplicación industrial. Lanciotti *et al.* (2006), elaboraron queso tipo *Caciotta* con leche tratada por HAP, comparándola con leche pasteurizada (HTST) y cruda. En este estudio, se muestra la reducción de la carga microbiana

acompañada de la mejora en el rendimiento de la cuajada, con un aumento en el nivel de proteólisis y lipólisis. Burns *et al.* (2008), elaboraron queso tipo *Crescenza* con leche HAP, mostrando un aumento en el rendimiento de la cuajada y afectando positivamente la viabilidad de los microorganismos probióticos empleados en su elaboración, además de exhibir un efecto positivo en el nivel de proteólisis y lipólisis mostrado, sin ser observada ninguna diferencia sensorial con respecto a los quesos elaborados con leche pasteurizada (HTST). Resultados similares en el aumento del rendimiento de la cuajada fueron observados por Ruiz-Espinosa *et al.* (2008), en la elaboración de queso tipo *Panela*. Ferragut *et al.* (2009), emplearon leche de soya tratada por HAP para la elaboración de una bebida tipo yogurt, comparándolo con uno elaborado con leche de soya sin tratamiento HAP; los resultados muestran una mayor capacidad de retención de agua, además de una mayor firmeza del producto durante el tiempo de almacenamiento.

Conclusión

El uso de la HAP demostró su eficacia en la inactivación de distintos microorganismos de interés en alimentos fluidos. Aún cuando existen variaciones en el nivel de inactivación logrado para los distintos grupos microbianos (atribuibles a factores intrínsecos y extrínsecos del proceso), los datos reportados en la bibliografía indican que es posible obtener una reducción importante de la carga microbiana; sin embargo, se requiere de mayor investigación antes de proponer su uso como sustituto de procesos térmicos tradicionales, incluyendo la pasteurización. De manera adicional, la posibilidad de ampliar las aplicaciones industriales para esta tecnología se ven favorecidas debido al desarrollo de

propiedades funcionales únicas en los fluidos tratados por HAP.

Referencias

- Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M. R. y Sinigaglia, M. 2007. Effects of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*. 45:382–386.
- Briñez, W. J. 2006. Estudio de la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de microorganismos en alimentos líquidos. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección de los equipos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A., Hernández Herrero, M. y Guamis B. 2006. Inactivation of *Staphylococcus spp.* strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenization at inlet temperatures of 6 and 20°C. *Food Control*. 18:1282–1288.
- Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R. y Guerzoni, M. E. 2008. Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*. 91:500–512.
- Capra, M. L., Patrignani, F., Quiberoni, A. L., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R. y Guerzoni, M. E. 2009. Effect of high pressure homogenization on lactic acid bacteria phages and probiotic bacteria phages. *International Dairy Journal*. 19:336–341.
- Chaves-López, C., Lanciotti, R., Serio, A., Paparella, A., Guerzoni E. y Suzzi, G. 2009. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. *Food Control*. 8: 691-695.
- Cruz, N., Capellas, M., Hernandez, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., Ferragut, V. 2007. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*. 40:725–732.

- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. y Kelly, A. L. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*. 72:1–7.
- Diels, A., Wuytack, E. y Michiels, C. 2003. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 87:55–62.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B. y Michiels, C. W., 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress*. 20:1512–1517.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B. y Michiels, C. W. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*. 101:281–291.
- Diels, A. M. J. y Michiels, C. W. 2006. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 32:201–216.
- Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., y Martin, J. H. 1997. Effects of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* in ice cream mix. *Journal of Dairy Science*. 80:2184–2187.
- Ferragut, V., Cruz, N. S., Trujillo, A., Guamis, B. y Capellas, M. 2009. Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. *Journal of Food Engineering*. 92: 63–69.
- Fluory, J., Desrumaux, A. y Lardières, J. 2000. Effect of high pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovations in Food Science Emerging Technology*. 1(3):127–134.
- Freeman, M. 2007. Comunicación personal. Stansted Fluid Power Ltd.
- Geciova, J., Bury, D. y Jelen, P. 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review. *International Dairy Journal*. 12:541–553.
- Hayes, M. G., Fox, P. F. y Kelly, A. L. 2005. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*. 72: 25–33.
- Jean, J., Burton, B., Darveau, D. y Fliss, I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec. 5593–5600.
- Kheadr, E., Vachon, J. F., Paquin, P. y Fliss, I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 12:435–446.
- Kleining, A. R. y Middleberg, P. J. 1998. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*. 53:5: 891–898.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Angellini, P. y Guerzoni, M.E. 1994. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 18:314–322.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M. y Guerzoni, M.E. 1996. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 165–168.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Pittia, P. y Guerzoni, M. E. 2004. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yogurt. *Food Microbiology*. 2:753–760.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Lucci, L., Vallicelli, M., Ndagijimana M., y Guerzoni, M. E. 2006. Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of *Caciotta* cheese. *Journal of Dairy Research*. 73:216–226.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Lucci, L., Saracino, P., Guerzoni, M. E. 2007. Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of

- proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chemistry*. 102:542–550.
- Miller, J., Rogowski, M. y Kelly, W. 2002. Using a CFD model to understand the fluid dynamics promoting *E. coli* breakage in a high-pressure homogenizer. *Biotechnology Progress*. 18:1060–1067.
- Moroni, O., Jeana, J., Autretb, J. y Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal*. 12:907–913.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V. y Swanson, G. 1999. High Pressure Treatment in Food Preservation. En: *Handbook of Food Preservation*. M.S. Rahman (ed). Marcel Dekker Inc. EUA.
- Paquin, P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Journal of Dairy Science*. 9:329–335.
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cefstel, J. C. y Dumay, E. 2006. Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*. 73:454–463.
- Popper, L. y Knorr, D. 1990. Applications of high pressure homogenisation for food preservation. *Food Technology*. 44 (7) 84–89.
- Ruiz-Espinosa, H., Martínez-Valencia B., Arellanes-Lozada, P., Amador-Espejo, G. y Welti-Chanes, J. 2008. “Panela Cheese Elaborated With High-Pressure Homogenized Milk”. Presentación oral. III International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. 14-17 de Octubre de 2008. Querétaro, México.
- Schultz, S., Wagner, G. y Urban, K. 2004. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering and Technology*. 27(4):361–368.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. y Livney, Y. D. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*. 21(5-6):936–942.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B. y Ferragut, V. 2007. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows’ milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*. 17:782–790.
- SFP. Stansted Fluid Power Ltd. 2005. *G7400 Series homogenizer Operating Instructions*. 3rd. Ed. Essex, Reino Unido. pp 24–38.
- Smiddy, M. A., Martin, J., Huppertz, T. y Kelly, A. 2007. Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal*. 17: 29–32.
- Tahiri, I., Makhoulf, J., Paquin, P. y Fliss, I. 2006. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. *Food Research International*. 39. 98–105.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P. y Cefstel, J. C. 2003. High-Pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*. 13:427–439.
- Vachon, J. F. Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P. y Fliss, I. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*. 65(2): 345–352.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J. y Michiels, C. W. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 77: 205–212.