



Inactivación de esporas de *Aspergilli* con radiación UVC y sorbato de potasio en néctar de durazno

J.A. Del Campo-Sacre*, D.X. Flores-Cervantes, J.J. Gómez-Díaz, A. López-Malo Vigil, M.T. Jiménez-Munguía y E. Palou-García

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Fundación Universidad de las Américas Puebla. Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla. C.P.72820. México.

Resumen

Los procesos no térmicos están siendo estudiados para minimizar la degradación de la calidad de alimentos manteniendo su seguridad. La radiación ultravioleta de onda corta (UVC) se ha sugerido para el procesamiento de alimentos debido a su efecto letal sobre los microorganismos. El objetivo de este trabajo fue la determinación de la eficacia de la radiación UVC para la eliminación de esporas de *Aspergillus niger* o *A. flavus* en néctar de durazno, además del tratamiento del néctar con diferentes concentraciones de sorbato de potasio (SK). El efecto de la radiación UVC en las cuentas en placa de los mohos mostró una reducción logarítmica de 3 y 4 ciclos para *A. niger* y *A. flavus*, respectivamente, después de 60 minutos de tratamiento, cuando el néctar fue recirculado a 1.36 L/min. El método con sorbato de potasio como antimicrobiano produjo una reducción de más de 3 ciclos logarítmicos a altas concentraciones durante 7 días. Se hizo, también, la modelación con el método Weibull obteniéndose un buen ajuste.

Palabras clave: radiación UVC, sorbato de potasio, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.

Abstract

Non-thermal processes are being studied in order to minimize quality degradation in foods while maintaining their safety. Short-wave ultraviolet light (UVC) for food processing has been suggested due to its lethal effect on microorganisms. The objective of the present study was to determine the efficacy of UVC irradiation to eliminate spores of *Aspergillus niger* or *A. flavus* in peach nectar and peach nectar with selected potassium sorbate (KS) concentrations. The effect of UVC on standard plate and inoculated mold counts resulted in a 3 and 4-log cycle reduction after a 60 min treatment when the nectar was circulated at 1.36 L/min. The method with KS as antimicrobial produced a reduction of more than 3 logarithmic cycles with high concentrations for 7 days. Weibull modelation was also approached with a good adjustment.

Keywords: UVC radiation, potassium sorbate, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.

*Programa de Maestría en Ciencias de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: josea.delcampos@udlap.mx

Introducción

Actualmente, el consumidor está preocupado por contar con productos alimenticios que garanticen la inocuidad microbiana con amplia vida de almacenamiento, manteniendo las características y propiedades nutritivas de un alimento fresco. La tendencia actual hacia lo mínimamente procesado ha llevado a que se investiguen nuevos procesos de conservación de alimentos, ya que los procesos térmicos que son regularmente utilizados provocan algunos efectos negativos en la calidad de los productos (López-Malo y Palou, 2005).

Dentro de los nuevos procesos estudiados se encuentran las llamadas tecnologías emergentes para el control microbiano, como la radiación ultravioleta de onda corta (UVC), de longitudes de onda entre 200 y 280 nm. La acción letal de la radiación UVC sobre microorganismos ha sido demostrada (López-Malo y Palou, 2005; Rahman, 2007) y, a diferencia de otras tecnologías, es segura, amigable con el medio ambiente y requiere de costos de instalación y operación más bajos que otros métodos. Sin embargo, por su poca profundidad de penetración, se usa generalmente para esterilizar aire y capas delgadas de líquido.

No obstante, desde 1999, la FDA (Food and Drug Administration) de los EE.UU. considera los tratamientos con radiación UVC como una alternativa para eliminar microorganismos patógenos de jugos de frutas, reteniendo sus niveles de vitaminas y llamando al producto “ligeramente procesado” (Food and Drug Administration, 2000). Como la radiación UVC es poco penetrante y los microorganismos deben ser expuestos directamente, aquéllos que estén protegidos por sólidos no serán afectados (López-Malo y Palou, 2005); este tratamiento se ha usado para controlar el crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en capas delgadas de azúcar (Weiser, 1962), así como para tratar pescado fresco (Huang y Toledo, 1982), cascarón de huevo (Kuo *et al.*, 1997), y carne (Reagan *et al.*, 1973), entre otros productos. También se ha utilizado para desinfectar agua, asegurando el 99.999% de destrucción microbiana después de un minuto de tratamiento, sin cambiar el color, olor o pH (Snowball y Hornsey, 1988). Actualmente, existe

gran interés en utilizar radiación UVC para reducir la carga microbiana en jugos de frutas y verduras (Bintsis *et al.*, 2000).

López-Malo *et al.* (2001b) utilizaron radiación UVC en jugo de zanahoria para disminuir la carga microbiana, observándose reducciones importantes con cambios mínimos en las características físicas y, además, sin efectos negativos en los atributos sensoriales. Wright *et al.* (2000) usaron un equipo de desinfección UVC de capa delgada para tratar sidra de manzana sin previa pasteurización e inoculada con *Escherichia coli* O157:H7; utilizando varios flujos (de 0.999 a 6.48 L/min) con 94 a 610 J/m² y encontraron una reducción de 3.81 ciclos logarítmicos. Por otro lado, Farid *et al.* (2001) realizaron un tratamiento sobre una capa delgada de jugo de naranja cayendo sobre un sistema UV a 214.2 W/m² y encontraron que el jugo aumentaba su vida de anaquel al doble, sin cambios en el color o sabor.

En jugos de frutas y bebidas, los sorbatos son utilizados normalmente en el periodo de preprocesado, junto con dióxido de azufre y pasteurización, para inhibir el deterioro químico, enzimático o microbiológico (Stopforth *et al.*, 2004). Combinaciones de sorbatos con dióxido de azufre son utilizadas para la conservación de jugos de frutas con pulpa; en este caso, el sorbato actúa como inhibidor microbiológico, y el dióxido de azufre previene la oxidación y el deterioro enzimático (Lück, 1980). Así mismo, el sorbato de potasio y el benzoato de sodio fueron efectivamente utilizados para reducir las concentraciones de levaduras y mohos en jugo de tomate (Bizri y Wahem, 1994). Los sorbatos, en general, pueden ser más adecuados para los productos de frutas que otros conservadores por sus propiedades organolépticas suaves y su sabor neutral. Sin embargo, normalmente se usan los sorbatos en combinación con otros métodos en la conservación de jugos de frutas, inhibiendo el crecimiento de mohos (Stopforth *et al.*, 2004).

Por otro lado, las especies de *Aspergillus* son contaminantes comunes de varios sustratos orgánicos, regularmente en regiones tropicales y subtropicales. El interés en el estudio de *Aspergillus* se debe a que ciertas especies son

patógenas y tienen la habilidad de producir metabolitos tóxicos (ácido 3-nitropropiónico, ácido ciclopiazónico y aflatoxinas B). Las aflatoxinas B son la forma más activa de las aflatoxinas (producto de *A. flavus*) que provocan necrosis hepática, coagulopatía, hemorragias, cáncer y hasta la muerte en humanos, por lo que se debe controlar su nivel en los alimentos para evitar los efectos de la aflatoxicosis (Hayes, 1981; Pier y Richard, 1992). Además, *A. niger* sintetiza ácidos orgánicos que disminuyen el pH del alimento produciendo sabores y olores indeseables, así como ennegrecimiento en frutas. Conjuntamente, en altas concentraciones, provoca *aspergillosis*, enfermedad que causa alteraciones pulmonares (MedlinePlus Medical Encyclopedia, 2006).

La importancia de este trabajo se centra en estudiar la eficacia del tratamiento con radiación UVC o con sorbato de potasio para inactivar esporas de *A. flavus* y *A. niger* en néctar de durazno.

Materiales y métodos

Se utilizó néctar de durazno pasteurizado con pH de 3.18 ± 0.01 , acidez titulable de $0.65 \pm 0.06\%$ (ácido málico), 13.40 ± 0.59 °Bx y valores de reflectancia (color) de 27.95 ± 0.04 para *L*, -0.60 ± 0.06 para *a* y 16.11 ± 0.03 para *b*. Cada muestra de néctar de durazno tuvo una carga inicial del orden de 10^4 esporas/mL (determinado experimentalmente al tiempo cero). Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado.

1. Tratamiento con UVC

El sistema para dar el tratamiento con radiación UVC consiste de dos lámparas UVC de 1.5 cm de diámetro y 82 cm de largo (40 W, 254 nm, baja presión; G37T6VH, Light Sources, EE.UU.) cada una, protegidas por un cilindro de cuarzo de 2.5 cm de diámetro, que a su vez están localizadas dentro de un tubo de acero inoxidable de 7.5 cm de diámetro. El néctar fluye en el ánulo entre el tubo de acero y el cilindro de cuarzo impulsado por una bomba peristáltica (7553-71, MasterFlex, EE.UU.), manteniendo un flujo constante de 1.36

L/min. El néctar pasa a un vaso de doble pared conectado a un baño termostático (1268-24, Polystat, México) que mantiene la temperatura a 25 ± 1 °C. El volumen total de néctar recirculado es 2.5 L por corrida (1 L por lámpara y 500 mL en el vaso de doble pared y mangueras). Se obtuvieron alícuotas de 1 mL a los 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 60 minutos de tratamiento con radiación UVC, las cuales fueron usadas para realizar el análisis microbiológico.

2. Tratamiento con sorbato de potasio (SK)

Frascos previamente esterilizados fueron llenados con 100 mL de néctar, el cual contenía una carga inicial de *A. flavus* o *A. niger* de 10^4 esporas/mL (determinado experimentalmente al tiempo cero) y se les añadió sorbato de potasio en una concentración determinada (0, 250, 500, 1000, 1500 ó 2000 ppm). Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada sistema cada 24 horas durante 7 días para su siembra y el conteo de esporas subsecuente.

3. Siembra, conteo de esporas y modelación

Las muestras de cada tratamiento fueron sembradas por medio del método de siembra por extensión en superficie, por duplicado y en cajas Petri con agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol DRBC (Becton Dickinson DIFCO, EE.UU.), para después incubarlas a una temperatura de 25°C y hacer el conteo de las esporas después de 5 a 7 días. Se determinaron las curvas de inactivación (log N/No contra tiempo de tratamiento) de cada uno de los microorganismos estudiados con cada tratamiento y se escogieron las que mostraron la pendiente negativa, ya que es un parámetro esencial para la modelación. Se realizó el modelado matemático de estas curvas de inactivación utilizando la ecuación de Weibull y ajustando los datos de cada curva a la forma acumulativa de la distribución de resistencias de Weibull, cuyo modelo es:

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

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 utilizando KaleidaGraph (3.52, Synergy Software, EE.UU) con el valor de Chi cuadrada.

4. Comparación de tratamientos y propuesta

A partir de las curvas de inactivación y la modelación, se hicieron comparaciones entre los tratamientos con UVC y con sorbato de potasio. Utilizando las predicciones del modelo que arroje la máxima reducción de esporas, se determinaron las mejores condiciones para el tratamiento de néctar de durazno (Del Campo-Sacre, 2009).

Resultados y discusión

1. Tratamiento con UVC

Se obtuvieron las curvas de inactivación de ambos microorganismos (Fig. 1). Se observó una

reducción de 3.02 ciclos logarítmicos para *A. niger* y 4.09 ciclos logarítmicos para *A. flavus* después de 60 minutos de tratamiento. Es importante destacar que *A. niger* mostró mayor resistencia al tratamiento, ya que presentó una menor reducción de ciclos logarítmicos. Sin embargo, la inactivación fue efectiva para ambos mohos, ya que se observó una reducción importante de los microorganismos. La reducción fue menor a la obtenida por López-Malo *et al.* (2001a) para inactivar la flora nativa de jugo de zanahoria, la cual fue de cinco ciclos logarítmicos después de 30 minutos de tratamiento con UVC con un sistema vertical. Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas (2005) obtuvieron una reducción de 1.34 ± 0.354 ciclos logarítmicos para *Saccharomyces cerevisiae*, valor menor a los obtenidos en el presente trabajo; sin embargo, también obtuvieron valores mayores, de 4.29 ± 2.34 y 5.10 ± 1.12 ciclos logarítmicos para *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, respectivamente, en jugo de manzana (con flujo de 548 mL/min).

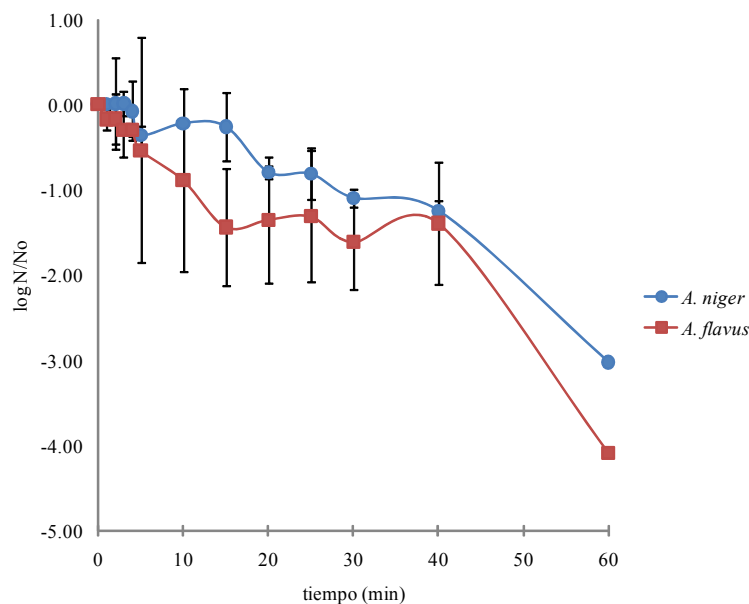


Fig. 1. Curvas de inactivación de *A. niger* y *A. flavus* en néctar de durazno tratado con radiación ultravioleta de onda corta (254 nm)

2. Tratamiento con sorbato de potasio (SK)

Para evaluar la acción antimicrobiana del sorbato de potasio se hicieron tomas de alícuotas de 1 mL de la muestra inoculada y con antimicrobiano, durante 7 días. *A. niger* presentó una reducción microbiana de 3.3 ciclos logarítmicos con 2000 ppm de antimicrobiano después de dos días y hasta el final del periodo de evaluación (Fig. 2). A una concentración de 1000 ppm de sorbato de potasio, el valor máximo de este antimicrobiano aceptado

para jugos y néctares de frutas en México (Secretaría de Salud, 1994), se observó una reducción de 1.3 ciclos logarítmicos después de siete días de almacenamiento. Las reducciones microbianas observadas a concentraciones de 500 y 250 ppm fueron menores.

Por otro lado, para las esporas de *A. flavus* con 1500 y 2000 ppm del antimicrobiano, se obtuvo la reducción de 3.1 ciclos logarítmicos en los primeros días de evaluación (Fig. 3). Sin embargo,

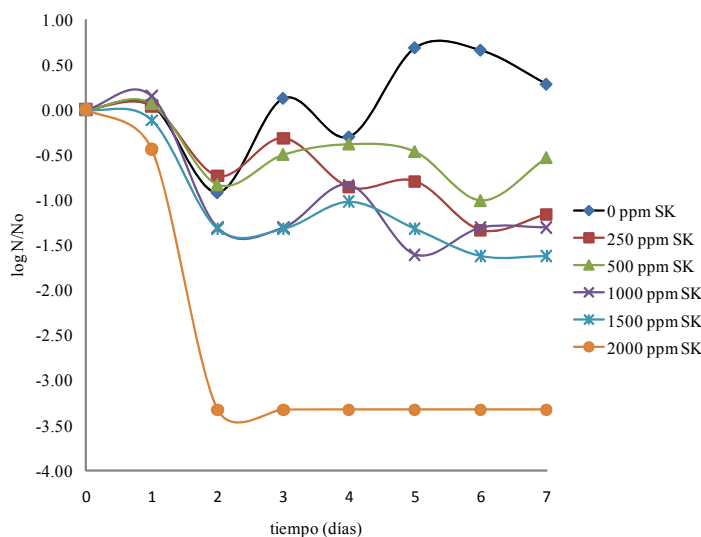


Fig. 2. Curvas de inactivación de *A. niger* en néctar de durazno tratado con sorbato de potasio (SK)

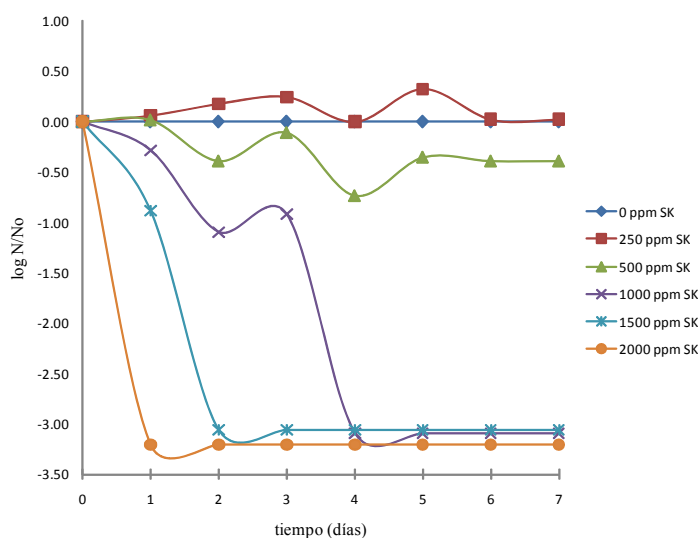


Fig. 3. Curvas de inactivación de *A. flavus* en néctar de durazno tratado con sorbato de potasio (SK)

con 1000 ppm se logró la misma reducción, después de 4 días de tratamiento. Igual que en el caso de *A. niger*, la reducción microbiana causada por la adición de 250 y 500 ppm de SK sobre el crecimiento de *A. flavus* fue muy baja.

3. Modelación Weibull

Las curvas que mostraron mejor inactivación y pendientes negativas, tanto para *A. niger* como para *A. flavus*, fueron las correspondientes a los tratamientos con radiación UVC. Por tanto, dichas

curvas fueron utilizadas al aplicar el modelo de Weibull.

La Tabla 1 muestra los parámetros determinados con el modelo de Weibull (b y n) para cada curva que haya presentado tendencia negativa. Entre más pequeño sea el valor de Chi cuadrada (Chisq) hay mejor aproximación de la predicción a la curva experimental, lo que se puede apreciar en la Fig. 4. Por lo que se puede mencionar que hubo una buena aproximación del modelo a los datos experimentales.

Tabla I. Parámetros del modelo Weibull para el tratamiento con radiación ultravioleta de onda corta (254 nm) aplicado a néctar de durazno inoculado con *A. niger* y *A. flavus*

	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
b	$6.17 \times 10^{-3} \pm 3.1 \times 10^{-3}$	$6.75 \times 10^{-5} \pm 9.53 \times 10^{-5}$
n	1.50 ± 0.129	2.56 ± 0.35
Chisq	0.286	0.339
R	0.983	0.966

Chisq : Chi cuadrada; R : Coeficiente de correlación

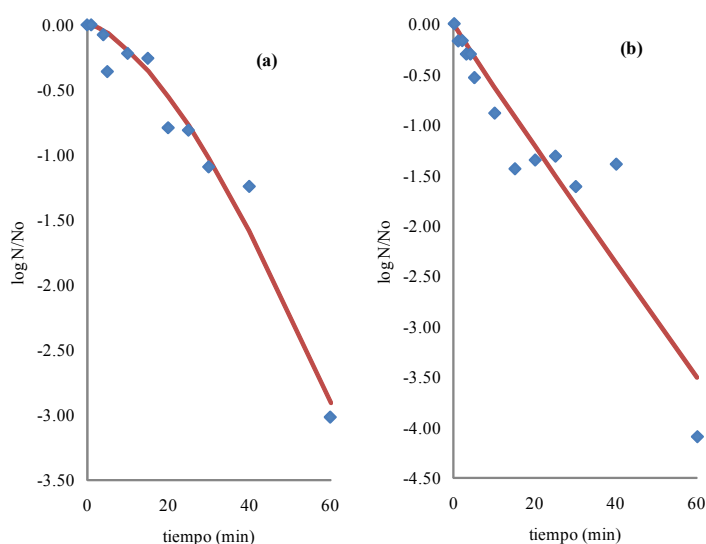


Fig. 4. Modelación Weibull del tratamiento con radiación ultravioleta de onda corta (254 nm) para a) *A. niger* y b) *A. flavus* (— Resultados experimentales; — Resultados predichos por el modelo)

4. Comparación de tratamientos y propuesta

Para *A. flavus*, el tratamiento con radiación UVC durante 60 minutos mostró mayores reducciones logarítmicas que aquel con sorbato de potasio a cualquiera de las concentraciones probadas. En el caso de *A. niger*, sólo la adición de 2000 ppm de sorbato de potasio dio lugar a una reducción similar a la lograda al tratar el néctar con radiación UVC durante 60 min. Por esta razón, se propone el uso de radiación UVC durante 60 minutos para la inactivación de estos microorganismos en néctar de durazno.

Conclusión

El tratamiento con radiación UVC mostró reducciones logarítmicas altas de ambos mohos. Las esporas de *A. niger* mostraron mayor resistencia que las de *A. flavus*.

La radiación UVC se puede utilizar como método no térmico para inactivar las esporas de *A. niger* y *A. flavus*; sin embargo, se requiere el estudio con otros microorganismos y a diferentes condiciones para obtener productos seguros.

El tratamiento con sorbato de potasio obtuvo reducciones logarítmicas altas a concentraciones mayores a la aceptada por las normas de México para jugos y néctares de frutas.

A partir de lo observado, se propone el posterior estudio del tratamiento combinando radiación UVC y sorbato de potasio, dejando actuar el compuesto antimicrobiano durante mínimo cuatro días, para poder estudiar su efecto sobre los microorganismos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del proyecto al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), como parte del Apoyo para Investigadores Nacionales para el Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y

Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura. También agradecen el financiamiento de Fundación Produce Puebla para el proyecto "Tecnologías para el Procesamiento de Durazno".

Referencias

- Bintsis, J.R., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Robinson, R. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry: a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:637-645.
- Bizri, J.N. y Wahem, I.A. 1994. Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice. *Journal of Food Science*. 59:130-134.
- Del Campo-Sacre, J.A. 2009. *Inactivación de esporas de Aspergilli mediante la combinación de radiación ultravioleta de onda corta y agentes antimicrobianos en néctar de durazno*. Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas Puebla.
- Farid, M.M., Chen, X.C. y Dost, Z. 2001. Ultraviolet sterilization of orange juice. En J. Welti-Chanes, G.V. Barbosa-Cánovas y J.M. Aguilera (Eds). *Proceedings of the eighth international congress of engineering and food*. Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster. pp. 1567-1572.
- Food and Drug Administration. 2000. *FDA approves the use of ultraviolet radiation for juice*. Food safety initiative. Center for food safety and applied nutrition. <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-uv.html>, accesada 02/05/2009.
- Guerrero-Beltrán, J.A. y Barbosa-Cánovas, G.V. 2005. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *Journal of Food Process Engineering*. 28:437-452.
- Hayes, A.W. 1981. Mycotoxin teratogenicity and mutagenicity. En: J.W. Bennet y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus: Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. Stoneham. pp. 241-243.
- Huang, Y.W. y Toledo, R. 1982. Effect of high and low intensity UV irradiation on surface microbiological counts and storage-life of fish. *Journal of Food Science*. 47:1667-1669, 1731.
- Kuo, F.L., Carey, J.B. y Ricke, S.C. 1997. UV irradiation of shell eggs: effect on populations of

- aerobes, moulds, and inoculated *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Protection*. 60:639-643.
- López-Malo, A. y Palou, E. 2005. Ultraviolet light and food preservation. En: G.V. Barbosa-Cánovas, M.S. Tapia y P. Cano (Eds). *Novel Food Processing Technologies*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 405-421.
- López-Malo, A., Medrano, A. y Palou, E. 2001a. Short-wave ultraviolet irradiation effects on red beet juice. *Tercer Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA III)*. Valencia, España. Marzo.
- López-Malo, A., Palou, E., Arce-García, M.R., Beristain, L., Bermudez-Aguirre, D. y Gómez-Díaz, J.J. 2001b. Short-wave ultraviolet light irradiation effects on carrot juice. *Institute of Food Technologists Annual Meeting*. New Orleans, EE.UU. Junio.
- Lück, E. 1980. Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects. En: P.M. Davidson, J.N. Sofos y A.L. Branen (Eds). *Antimicrobials in Food*. CRC Taylor and Francis Group. Boca Ratón, EE.UU. pp. 49-90.
- MedlinePlus Medical Encyclopedia. 2006. *Aspergillosis*. U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html>, accesada 13/02/2009.
- Peleg, M. y Cole, M.B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*. 38(5):353-380.
- Pier, A.C. y Richard, J.L. 1992. Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by *Aspergilli*. En J.W. Bennet y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Butterworth-Heinemann. Stoneham, EE.UU. pp. 241-243.
- Rahman, S. 2007. *Handbook of food preservation*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU.
- Reagan, J.O., Smith, C.G. y Carpenter, Z.L. 1973. Use of ultraviolet light for extending the retail caselife of beef. *Journal of Food Science*. 38:929-931.
- Snowball, M.R. y Hornsey, I.S. 1988. Purification of water supplies using ultra-violet light. En R.K. Robinson (Ed) *Developments in Food Microbiology-3*. Elsevier Applied Science. Londres, Inglaterra. pp. 171-192.
- Secretaría de Salud. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. SSA. México.
- Stopforth, J.D., Sofos, J.N. y Busta F.F. 2004. Sorbic acid and sorbates. En: P.M. Davidson, J.N. Sofos y A.L. Branen (Eds). *Antimicrobials in Food*. CRC Taylor and Francis Group. Boca Ratón, EE.UU. pp. 49-90.
- Weiser, H.H. 1962. *Practical food microbiology and technology*. AVI Publishing. Westport, EE.UU.
- Wright, J.R., Summer, S.S., Hackney, C.R., Pierson, M.D. y Zoecklein, B.W. 2000. Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider. *Journal of Food Protection*. 63(5):563-567.