

MÉTODO PARA INACTIVAR ESPORAS DE MOHO

Campo de la invención

Esta invención se refiere a la inactivación de esporas de moho en una bebida, utilizando pasteurización en presencia de natamicina.

Antecedentes de la invención

El deterioro de los alimentos puede ser causado por hongos, levaduras y bacterias. Debido a la gran escala a la que se fabrican los productos alimenticios, la consecuencia del deterioro es una grave pérdida económica para la industria alimentaria. Los microorganismos son los principales agentes responsables del deterioro de los alimentos y, por lo tanto, los procedimientos de conservación de alimentos están dirigidos a ellos. Los métodos de conservación de alimentos utilizados actualmente por la industria, se basan en la inhibición del crecimiento microbiano o en la inactivación microbiana. Algunos ejemplos de procedimientos para la conservación de alimentos son el secado, la salazón, el tratamiento térmico, y la fermentación.

El tratamiento térmico es el procedimiento más utilizado. Sin embargo, el calor puede desencadenar reacciones no deseadas, dando lugar a efectos organolépticos y nutricionales indeseables. La magnitud de este problema aumenta rápidamente al aumentar la temperatura y los tiempos de residencia. Además, otro inconveniente del tratamiento térmico, como la pasteurización, es que una fracción de la población de esporas generalmente sobrevive, lo que lleva a la descomposición del producto después de períodos prolongados de tiempo. Por lo general, se busca un equilibrio entre la temperatura más baja posible, o los tiempos de residencia, por un lado, y las cantidades aceptables de esporas sobrevivientes, por otro lado. Estas limitaciones, junto con la creciente demanda de los consumidores de alimentos frescos, ha promovido el desarrollo de métodos alternativos para la conservación de los alimentos.

Durante muchas décadas, la natamicina antimicótica macrólido de polieno se ha utilizado para prevenir el crecimiento de hongos en productos alimenticios como quesos y salchichas. Este conservador natural, que se produce por medio de la fermentación con *Streptomyces natalensis*, se usa ampliamente en todo el mundo, y tiene una larga historia de uso seguro en la industria alimentaria. Es muy efectivo contra todos los hongos que producen la descomposición en alimentos conocidos. El uso de natamicina en bebidas, especialmente bebidas como té helado, se ha descrito en los documentos US 5,738,888 y US 5,773,062, solos o combinados con otros conservadores, como el ácido benzoico, el ácido sórbico y los dicarbonatos de dialquilo, tal como en los documentos EP 977499 y US 5,895,681.

Desafortunadamente, un problema asociado con el uso de natamicina en bebidas con un pH bajo, es que este compuesto no es estable en un ambiente ácido (H. Brik, J. Antibiot. 29 (1976), 632-637) y, en consecuencia, pierde eficacia con el tiempo, más o menos rápidamente, dependiendo del valor de pH en cuestión. La pérdida de estabilidad de la natamicina se abordó en el documento US 2005/042341 encapsulando la natamicina, un concepto también descrito en los documentos US 2010/310722 (natamicina con povidona), y US 2010/323065 (natamicina con ciclodextrina). Combinado con el hecho de que se sabe que la natamicina solo previene la germinación de esporas de hongos, sin destruirlas, da como resultado una situación en la que las esporas en bebidas ácidas pueden germinar con el tiempo, cuando toda la natamicina se ha degradado. Véase, por ejemplo, el documento US 2005/112251 que describe la prevención de la germinación de *Talaromyces macrosporus* usando 2.5 ppm de natamicina y tratamiento térmico en jugo de manzana, sin embargo, solo durante unos días, suponiendo el tiempo que tarda la natamicina en degradarse en condiciones ácidas. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para prevenir la germinación de esporas de moho en bebidas ácidas, de preferencia, por medio de inactivación, es decir, por medio de la muerte de las esporas.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender", "incluir" y "tener", y las variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye", deben interpretarse de manera inclusiva. Estas palabras están destinadas a transmitir la posible inclusión de otros elementos o enteros no específicamente recitados, donde el contexto lo permita.

Los artículos "el, la" y "uno, una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

En el contexto de la invención, el término "bebida" se refiere a un líquido destinado al consumo humano. Los tipos comunes de bebidas incluyen agua, leche, jugos, café, té y refrescos. Además, las bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza, la malta y el licor, se denominan bebidas. Del mismo modo, las bebidas no alcohólicas que significan bebidas que normalmente contienen alcohol, como la cerveza, la malta y el vino, pero que se elaboran con menos del 0.5 por ciento de alcohol por volumen, también se conocen como bebidas. La categoría incluye bebidas que se han sometido a un proceso de eliminación de alcohol, como cervezas sin alcohol y vinos sin alcohol. Se entiende que una bebida no solo incluye composiciones listas para beber sino también concentrados que comprenden agua y al menos otro ingrediente. Además, una bebida puede comprender uno o más aditivos adicionales seleccionados entre agentes antiespumantes, sabores, agentes opacantes, agentes colorantes, agentes espesantes, vitaminas, aminoácidos, minerales, agentes espumantes, hidrocoloides, hierbas, compuestos nutraceuticos, reguladores de la acidez, conservadores, polisacáridos,

edulcorantes, emulsionantes, antioxidantes, fibras dietéticas, mono y polinucleótidos, polipéptidos, enzimas y mezclas de los mismos. Cada uno de estos materiales puede ser un solo componente, o una mezcla de dos o más componentes.

El término "pasteurización" se refiere al proceso de calentar un líquido por un período de tiempo, a una temperatura específica, luego inmediatamente seguido de enfriamiento. El proceso reduce el crecimiento de microorganismos dentro del líquido, aumentando así el tiempo antes del deterioro. Se usa principalmente en la leche, que antes de la pasteurización se infecta comúnmente con bacterias patógenas y, por lo tanto, es más probable que cualquier otra parte de la dieta común en el mundo desarrollado para causar enfermedades. Pero la pasteurización no se limita a la leche, ya que también se puede llevar a cabo en bebidas que se mencionan en la presente invención.

El término "inactivar esporas de moho" se refiere a la ausencia de germinación después de un cierto período de tiempo en el que las esporas no tratadas con natamicina todavía pueden germinar. En otras palabras, "inactivar esporas de moho" es un método irreversible, y se refiere a la eliminación de esporas.

El término "estable" se refiere a "estable microbianamente". La estabilidad microbiana de un producto alimenticio se puede expresar por el número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en dicho producto alimenticio, por ejemplo, el número de UFC por gramo de producto alimenticio (cuando es sólido o líquido) o, si el producto alimenticio es un producto alimenticio líquido, como el número de UFC/ml. Un producto alimenticio estable producido por el método de la invención, puede tener un número de UFC por g o ml, después de un cierto tiempo de almacenamiento, que es igual o menor en comparación con el número de UFC por g o ml en $t=0$. El tiempo de almacenamiento puede ser de hasta 6 semanas, de preferencia, hasta 12 semanas, de preferencia, hasta 6 meses, y de preferencia, a temperatura ambiente, por ejemplo, a 20°C, o 25°C. De preferencia, hasta dicho tiempo de almacenamiento, no se presenta un aumento en las UFC por g o ml, o de preferencia, incluso una disminución en la UFC por g o ml, por ejemplo, una reducción del 50%, o incluso una reducción del 75%, o una reducción del 90%. Incluso, de preferencia, no se presentan UFC en dicho producto alimenticio estable o estabilizado hasta el tiempo de almacenamiento. La bebida estable producida por el método de la invención también puede ser estable porque no hay olor después del tiempo y temperatura especificados, o porque no hay cambio de color después del tiempo y temperatura especificados.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para inactivar esporas de moho que comprende someter una bebida que tiene un pH de 2.0 a 4.0 (medido a 20±2°C) a una temperatura de 50°C a 90°C en presencia de natamicina.

De manera ventajosa, la natamicina se usa junto con la pasteurización como un medio de respaldo para combatir las esporas que sobrevivieron a la pasteurización. Según las prácticas actuales de pasteurización, la germinación de esporas residuales después del tratamiento, es un fenómeno común y a menudo no deseado. Sorprendentemente, la presencia de natamicina

mejora el efecto de la pasteurización, de modo que, en condiciones comparables, la pasteurización por sí sola no previene completamente la germinación, es decir, mata todas las esporas presentes, mientras que en presencia de natamicina no se produce germinación. Esto es inesperado porque la natamicina no es estable en condiciones ácidas y, por lo tanto, se espera que no esté presente en cantidades suficientes después de una incubación prolongada para ser eficaz como conservador contra el crecimiento de hongos.

En un alcance, la temperatura del método de la invención es de 60°C a 90°C, o de 65°C a 90°C, o de 70°C a 90°C, o de 80°C a 90°C. Dentro de este rango, por ejemplo, a temperaturas de 65±2° C, 70±2°C, 80±2°C y 85±2°C, el efecto agregado de la natamicina sobre el de la pasteurización es notorio. La duración del tratamiento térmico es comparable a los tiempos normalmente aplicados para la pasteurización, tal como lo conoce la persona experta. La pasteurización puede realizarse por lotes o en modo continuo con tiempos de contacto a la temperatura elevada en cuestión de 5 segundos a 30 minutos, o de 10 segundos a 10 minutos, o de 20 segundos a 5 minutos, o de 30 segundos a 2 minutos. Los tiempos de calentamiento o pasteurización pueden ser de 20±5 segundos, 30±5 segundos o 40±5 segundos.

En otro alcance, el pH durante el método de la invención es de 2.0 a 4.0, o de 2.5 a 3.8, o de 2.8 a 3.5, medido a 20±2°C.

La cantidad de natamicina utilizada en el método de la invención es similar a las cantidades aplicadas en la protección alimentaria regulada por natamicina, por ejemplo, de 1 a 200 ppm, o de 2 a 100 ppm, o de 3 a 50 ppm, o de 5 a 25 ppm, o de 10 a 20 ppm, con base en el peso total de la bebida.

Según el método de la invención, se observó la inhibición de patógenos durante períodos prolongados de tiempo, es decir, varias semanas o incluso 50 días. Este es un resultado sorprendente ya que no hay indicios en la técnica de que la combinación de natamicina y un tratamiento térmico relativamente corto provoque la inactivación irreversible de las esporas. El documento US 2005/112251 describe la prevención de la germinación de *Talaromyces macrosporus* CBS 130.89 usando 2.5 ppm de natamicina, pero aquí el paso del tratamiento térmico no es lograr la prevención de la germinación, sino todo lo contrario, estimular la germinación, ya que *Talaromyces macrosporus* es un organismo resistente al calor. Además, el efecto parece estar limitado a solo 4 días, lo cual es inferior a los resultados obtenidos en la presente invención.

En otro alcance, el método de la invención es adecuado contra una gama de esporas de moho. Algunos ejemplos son *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Talaromyces*. Las especies específicas son *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotti* y *Talaromyces (Rasamsonia) emersonii*.

Además, la invención proporciona una bebida que tiene un pH de 2.0 a 4.0 (medido a 20±2°C) que comprende natamicina y micosamina (CAS 527 38 8). La micosamina se forma bajo las condiciones del método del primer aspecto de la invención después de períodos de incubación prolongados. El compuesto no es conocido por ningún efecto antifúngico, ni es tóxico.

Las cantidades en las que está presente cualquier natamicina y micosamina son de 0.1 a 100 ppm cada una, o de 0.2 a 50 ppm cada una, o de 0.3 a 25 ppm cada una, con base al peso total de dicha bebida.

En un alcance, la bebida es té helado, agua con sabor, bebidas de frutas, zumos de frutas, una bebida gaseosa o limonada.

El pH de la bebida es de 2.0 a 4.0, o de 2.5 a 3.8, o de 2.8 a 3.5, medido a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

En un alcance, la bebida comprende al menos un compuesto adicional, de preferencia, un compuesto seleccionado de la lista que consiste en un regulador de acidez (tal como ácido cítrico), un agente antiaglomerante (tal como isomalt), un agente antiespumante (tal como metiletilcelulosa, o mono o di-glicéridos de ácidos grasos), un antioxidante (como vitamina C o sulfito), un color, un tensioactivo, un agente de retención de color, un emulsionante (como polietilenglicol, triacetina, citrato de trietilo, aceite de ricino, colina), sales tales como tartrato de colina o lactato, xilitol, lactitol, maltitol, polidimetilsiloxano, lauril sulfato de sodio y lecitina), un conservador adicional o un dispersante (como compuestos de polioxietileno como monolaurato de polioxietilén sorbitano/-monooleato/monoestearato//tristearato, celulosa, polivinilpirrolidona, o propilenglicol).

La invención tiene muchas ventajas. Una ventaja es que permite la inactivación de moho que han sobrevivido a la pasteurización. Otra es que se pueden utilizar protocolos de pasteurización más cortos o menos calientes.

EJEMPLOS

General

Las mediciones de pH se llevaron a cabo a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, a menos que se mencione lo contrario, utilizando un medidor de pH modelo Radiometer PHM210 equipado con un electrodo de pH combinado Calomel PHC4000-8 (D=5MM).

Para el análisis de micosamina a bajas concentraciones (nivel de ppb) se usa una preparación de muestra con un material SPE de intercambio catiónico para aislar la micosamina de la matriz de muestra o eliminar posibles impurezas interferentes de la misma. El análisis se realizó en LC-MS/MS en una columna ZIC-HILIC. Para la identificación y (semi) cuantificación se preparó una referencia de micosamina. La concentración de micosamina en esta referencia se determinó con $^1\text{H-NMR}$. Para confirmar el resultado, una muestra se enriqueció con una pequeña cantidad de referencia de micosamina antes del análisis, y el cromatograma se comparó con el de la muestra sin micosamina añadida.

Ejemplo 1

Tratamiento por calor de esporas de *Aspergillus niger* en ausencia y presencia de natamicina

El té helado comercialmente disponible (Lipton, sabor a durazno, sin gas, 1.5 l) se ajustó a una alta dureza del agua mediante la adición de 1 ml de una solución de 39 g de CaCl_2 , y 27 g de MgCl_2 a 934 g de agua. 1/3 de esta preparación de té helado (cuyo pH era 3.15) se dejó como tal, 1/3 de la preparación se enriqueció con 5 ppm de natamicina y 1/3 de la preparación se enriqueció con 10 ppm de natamicina. Se prepararon muestras de 5 ml de cada preparación en tubos de plástico estériles de 15 ml. De cada preparación, 8 muestras se precalentaron a la temperatura de pasteurización deseada usando un baño de agua. Las temperaturas utilizadas fueron RT, 60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90°C. Cuando se alcanzó la temperatura deseada, se añadieron 100 µl de una suspensión de esporas de 2500 esporas/ml de *Aspergillus niger* ATCC 9029AA a cada tubo. Posteriormente, las muestras se mantuvieron durante 30 segundos a la temperatura en cuestión en el baño de agua. A continuación, las muestras se enfriaron en hielo a una temperatura de 25°C. Las muestras se incubaron a 25°C y se examinaron visualmente para detectar crecimiento (formación de escamas de moho o turbidez) durante dos meses. Además, las muestras se enumeraron según el protocolo ISO 21527-1.2008 el día 0 (antes del tratamiento térmico), y el día 1 (después del tratamiento térmico) para contar la pérdida inmediata de viabilidad. La enumeración se repitió después de 1 mes cuando las muestras permanecieron libres de crecimiento visual de moho. La mayoría de los recuentos se redujeron a <10 después del tratamiento térmico, pero aun así pudieron crecer. Para los resultados, ver Tabla 1. A temperatura ambiente y 60°C, se observó el efecto normal de la natamicina: germinación retrasada en presencia de 5 ppm de natamicina, y retraso más prolongado en presencia de 10 ppm de natamicina. A 70°C se observó que se produjo la germinación sin natamicina (aparentemente el paso de calor por sí solo no fue suficiente para matar las esporas), mientras que en presencia de natamicina no se produjo germinación.

La muestra que contenía, a $t=0$, 10 ppm de natamicina (aproximadamente 10 mg/l) y que se calentó a 70°C se analizó por medio de LC-MS/MS y se encontró que contenía <0.04 mg/l de natamicina, y 2 mg/l de micosamina.

Ejemplo 2

Tratamiento por calor de esporas de *Aspergillus niger* en ausencia y presencia de natamicina

Por razones comparativas, el Ejemplo 1 se repitió con una cepa interna de *Aspergillus niger*. Los resultados de la enumeración fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Para los resultados, consulte la Tabla 2. A temperatura ambiente y 60°C, se observó el efecto normal de la natamicina: germinación retrasada en presencia de 5 ppm de natamicina y retraso más

prolongado en presencia de 10 ppm de natamicina a 65°C, 70°C y 80°C, se observó que se produjo la germinación sin natamicina (aparentemente el paso de calor por sí solo no fue suficiente para matar las esporas), mientras que en presencia de natamicina no se produjo germinación.

La muestra que contenía, a $t=0$, 10 ppm de natamicina (aproximadamente 10 mg/l) y que se calentó a 70°C se analizó por medio de LC-MS/MS y se encontró que contenía <0.04 mg/l de natamicina, y 2 mg/l de micosamina.

Ejemplo 3

Tratamiento por calor de esporas de *Talaromyces emersonii* en ausencia y presencia de natamicina

Sin embargo, el Ejemplo 1 se repitió con *Talaromyces emersonii* (CBS 236.58, 1000 esporas/ml) en lugar de *Aspergillus niger*. Los resultados de la enumeración fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Para los resultados, véase la Tabla 3. A temperatura ambiente, se observó el efecto normal de la natamicina: germinación retardada en presencia de 5 o 10 ppm de natamicina. A 75°C y 85°C, se observó que la germinación sin natamicina tuvo lugar (aparentemente el paso de calor por sí solo no fue suficiente para matar las esporas), mientras que en presencia de natamicina (10 ppm a 75°C y para ambas concentraciones a 85°C) no se produjo germinación. La muestra que contenía, a $t=0$, 10 ppm de natamicina (aproximadamente 10 mg/l) y que se calentó a 70°C se analizó por medio de LC-MS/MS, y se encontró que contenía <0.04 mg/l de natamicina, y 2 mg/l de micosamina.

Ejemplo 4

Tratamiento por calor de esporas de *Paecilomyces variotti* en ausencia y presencia de natamicina

Sin embargo, el Ejemplo 1 se repitió con *Paecilomyces variotti* (ATCC 22319, 1000 esporas/ml) en lugar de *Aspergillus niger*. Los resultados de la enumeración fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Para los resultados, véase la Tabla 4. A temperatura ambiente y 60°C, se observó el efecto normal de la natamicina: germinación retardada en presencia de 5 o 10 ppm de natamicina. A 90°C se observó que la germinación sin natamicina tuvo lugar (aparentemente el paso de calor por sí solo no fue suficiente para matar las esporas), mientras que en presencia de natamicina no se produjo germinación.

Tabla 1 *Aspergillus niger* ATCC 9029AA en té helado con 0 ppm, 5 ppm o 10 ppm de natamicina, en combinación con tratamiento térmico, que muestra crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-), después de x días.

[illegible]

Tabla 2 *Aspergillus niger* en té helado con 0 ppm, 5 ppm o 10 ppm de natamicina, en combinación con tratamiento térmico, que muestra crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-), después de x días.

[illegible]

Tabla 3 *Talaromyces emersonii* en té helado con 0 ppm, 5 ppm o 10 ppm de natamicina, en combinación con tratamiento térmico, que muestra crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-), después de x días.

[illegible]

Tabla 4 *Paecilomyces variotti* ATCC 22319 en té helado con 0 ppm, 5 ppm o 10 ppm de natamicina, en combinación con tratamiento térmico, que muestra crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-), después de x días.

[illegible]