



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

***OPTIMIZACIÓN DE LA PASTEURIZACIÓN DE
ZUMO DE NARANJA MEDIANTE
TRATAMIENTO TÉRMICO***

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: JOAN BORRÀS FERRER

TUTOR ACADEMICO: JOSÉ JAVIER BENEDITO FORT

DIRECTORA EXPERIMENTAL: INGRID PANIAGUA MARTÍNEZ

Curso Académico: 2019-2020

VALENCIA, DICIEMBRE 2020

OPTIMIZACIÓN DE LA PASTEURIZACIÓN DE ZUMO DE NARANJA MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO

RESUMEN

La popularidad del zumo de naranja ha generado la necesidad de conseguir un zumo envasado lo más similar posible al zumo natural 100% exprimido, tanto organoléptica como nutricionalmente. Para ello, se están llevando a cabo mejoras en los tratamientos del zumo para poder cumplir las expectativas del consumidor. En el presente TFM se han caracterizado los parámetros tiempo-temperatura de un pasteurizador de placas, para aplicar de manera experimental ensayos con tres niveles de inactivación, uno más agresivo para inactivar totalmente la flora microbiana y otros dos para reducir la población microbiana del zumo a distintos niveles. Los resultados obtenidos no mostraron ningún tipo de correlación entre la intensidad del tratamiento y la inactivación microbiana, probablemente debido a que, durante algún punto del tratamiento térmico, muestreo o siembra se contaminó la muestra.

Además, se planteó y resolvió un problema de optimización de tratamiento térmico de zumo de naranja, cuyo objetivo fue minimizar la pérdida de vitamina C cumpliendo con las restricciones de eliminación del 99,999% de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Escherichia coli* O157:H7 y de inactivación del 90% de la enzima PME. Se observó que al reducir el tiempo del tratamiento térmico y aumentar la temperatura de este, la retención de vitamina C es mayor, dando lugar a un zumo de mayor calidad.

PALABRAS CLAVE: Tratamiento térmico, pasteurización, zumo de naranja, optimización, *Escherichia coli*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Pectinmetilesterasa.

RESUM

La popularitat del suc de taronja ha generat la necessitat d'aconseguir un suc envasat el més similar possible al suc 100% natural espremut, tant organolèptica com nutricionalment. Per a això, s'estan duent a terme millores en els tractaments del suc per poder complir les expectatives dels consumidors. En el present TFM s'han caracteritzat els paràmetres temps-temperatura d'un pasteuritzador de plaques, per aplicar de manera experimental assaigs amb tres nivells de inactivació, un més agressiu per inactivar totalment la flora microbiana i altres dos per reduir la població microbiana del suc a diferents nivells. Els resultats obtinguts no van mostrar cap tipus de correlació entre la intensitat del tractament i la inactivació microbiana, probablement pel fet que, durant algun punt del tractament tèrmic, mostreig o sembra es va contaminar la mostra.

A més, es va plantejar i resoldre un problema d'optimització de tractament tèrmic de suc de taronja, l'objectiu va ser minimitzar la pèrdua de vitamina C complint amb les restriccions d'eliminació del 99,999% de *Alicyclobacillus acidoterrestris* i *Escherichia coli* O157: H7 i d'inactivació del 90 % de l'enzim PME. Es va observar que al reduir el temps del tractament tèrmic i augmentar la

temperatura d'aquest, la retenció de vitamina C és més gran, donat lloc a un suc de més qualitat.

PARAULES CLAU: Tractament tèrmic, pasteurització, suc de taronja, optimització, *Escherichia coli*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, pectinmetilesterasa.

ABSTRACT

The popularity of orange juice has created the need to achieve a packaged juice as similar as possible to 100% squeezed natural juice, both organoleptically and nutritionally. To this end, improvements are being made in the juice treatments in order to meet consumer expectations. In the present TFM, the time-temperature parameters of a plate pasteurizer have been characterized, to experimentally apply tests with three levels of inactivation, one more aggressive to completely inactivate the microbial flora and another two to reduce the microbial population of the juice to different levels. The results obtained did not show any type of correlation between the intensity of the treatment and the microbial inactivation, probably due to the fact that, during some point of the heat treatment, sampling or plating, the sample was contaminated.

In addition, an orange juice heat treatment optimization problem was proposed and solved, the objective of which was to minimize the loss of vitamin C by complying with the elimination restraints of 99.999% of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Escherichia coli* O157: H7 and of inactivation of 90 % of PME enzyme. It was observed that by reducing the heat treatment time and increasing its temperature, the retention of vitamin C was greater, giving place to a higher quality juice.

KEY WORDS: Heat treatment, pasteurization, orange juice, optimization, *Escherichia coli*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Pectinmethylesterase.

1. INTRODUCCIÓN

El zumo de naranja, debido a sus excelentes cualidades organolépticas como el color, aroma y sabor, y a sus propiedades nutricionales (alto contenido en vitamina C, carotenoides, capacidad antioxidante...) se encuentra entre los zumos más consumidos a nivel mundial (Rouseff et al., 2009). Según los datos ofrecidos por Sister (1996), la industria de zumos procesa anualmente algo más del 40 por ciento de la producción mundial de naranjas (52 millones de toneladas en el 2018, según Statista (2018)). Además, el consumo de zumo de naranja representa aproximadamente el 60% del consumo total de zumo y bebidas a base de zumo en los países occidentales (Fry et al., 1995), lo cual supone aproximadamente el consumo unos 5000 millones de litros de zumo de naranja por año en la Unión Europea (Brown, 2004).

Aunque en el mercado hay distintos tipos de zumo de naranja (natural, 100% exprimido, a partir de concentrado, néctar, batidos, bebidas refrescantes...), el zumo de naranja 100% exprimido (producto formado solamente a partir de zumo de naranja, al cual se le aplica un tratamiento térmico (OCU, 2020)), se está convirtiendo, cada vez más, en la forma de consumo más común de este producto, principalmente debido a su calidad organoléptica y vida útil. En este sentido, como el consumidor demanda cada vez un producto organolépticamente más similar al zumo de naranja recién exprimido, es decir, de calidad, con sabor, textura y color frescos, con un mínimo o sin conservantes químicos y, sobre todo, seguros (Cortés et al., 2008), es necesario llevar a cabo investigaciones para optimizar el tiempo y temperatura de exposición al calor.

A pesar de que el zumo fresco de naranja tiene un pH ácido, la estabilidad de éste es bastante limitada (Johnson, 2001). El deterioro del zumo de naranja se debe a la actividad enzimática causada principalmente por la pectinmetilesterasa (Kimball, 2012) y a la proliferación de la microflora osmófila y tolerante a los ácidos naturales presentes en el mismo. Esta microflora está compuesta por levaduras, responsables del sabor fermentado, que acompaña a la producción de dióxido de carbono; mohos, que contribuyen al deterioro del zumo por su crecimiento superficial y bacterias acidolácticas que pueden crecer en condiciones ácidas y producir un sabor desagradable de suero de leche (Ashurt, 1995, Beavens et al., 1962, Mc Allister, 1980, Shomer et al., 1994, Weissman, 1973). Además, algunas bacterias patógenas como, por ejemplo, *Salmonella spp* o *Escherichia coli* O157:H7, también pueden llegar hasta el zumo fresco no tratado durante la recolección de la fruta o en su procesamiento, lo que representa un notable riesgo de infección alimentaria, con importantes repercusiones económicas (Tahiri et al., 2006).

Por otra parte, es de destacar la existencia del *Alicyclobacillus acidoterrestris* (*A. acidoterrestris*) en zumos de frutas pasteurizados con elevada acidez, entre los cuales se encuentra el zumo de naranja. La capacidad de causar deterioro en zumos de esta bacteria supone una preocupación para el diseño de procesos de pasteurización térmica, ya que estas bacterias termófilas formadoras de esporas crecen bien en entornos de pH bajo (Moody, 2003). Las características de esta bacteria suponen un problema en los zumos de fruta refrigerados, ya que éstos se suelen pasteurizar a temperaturas inferiores al rango letal del

A.acidoterrestris (entre 85 °C y 95 °C), debido a que los microorganismos comúnmente encontrados en zumos ofrecen baja resistencia al calor (Eiroa et. al. 1999). Esta bacteria es un microorganismo de deterioro que debe ser tenido en cuenta por la industria del zumo, ya que, aunque no presenta un problema de seguridad para la industria, sí que supone un problema económico importante (Moody, 2003).

En cuanto a la degradación enzimática, la pectinmetilesterasa es la enzima que mayor impacto tiene en el zumo de naranja, ya que si no se inactiva produce el efecto adverso de clarificación. Esto da lugar a que se pierda la estabilidad de la nube, afectando a la turbidez, el sabor, el aroma y el olor característico del zumo de naranja (Baker & Cameron, 1999, Van den Broeck et al., 2000). Para aumentar la estabilidad del zumo de naranja natural, el tratamiento más comúnmente aplicado es la pasteurización térmica. Este proceso consiste en tratar el producto con calor para lograr la inactivación de las enzimas y los microorganismos naturales, aumentando así la estabilidad del zumo (Johnson, 2001). Como guía general, la FDA recomienda un tratamiento mínimo de temperatura-tiempo equivalente de 71.1 °C durante 3 s para los productos con un pH en el rango de 3-3,4. No obstante, se ha demostrado que esta combinación temperatura-tiempo es insuficiente para inactivar a todos los microorganismos presentes en el zumo (Timmermans et al.,2011).

En la pasteurización comercial del zumo de naranja, las condiciones comúnmente aplicadas son tratamientos de 10–30 s a 95–98 °C (Ringblom, 2017). La aplicación de estas condiciones, están basadas principalmente en la inactivación de > 90% de la enzima pectinmetilesterasa, ya que, como esta enzima es más resistente al calor que los microorganismos presentes en el zumo, con la inactivación de la misma se asegura también la de los microorganismos (Tribess & Tadini, 2006), la cual se alcanza con unos 3-4 s de tratamiento a 70 °C (Mazzotta, 2001).

No obstante, aunque la pasteurización térmica se considera una buena alternativa al zumo natural, por el aumento de la estabilidad y por seguir conservando una parte de la calidad organoléptica y nutricional del producto, la aplicación de altas temperaturas también tiene efectos negativos sobre el zumo. En particular, se produce la pérdida de componentes termolábiles y termosensibles, en proporción a la intensidad del tratamiento térmico, muchos de los cuales son los responsables de las características nutricionales (principalmente la vitamina C) y sensoriales (flavor) del zumo (Meza & Nancy, 2011, Polydera et al.,2004).

Así pues, debido a esta pérdida de calidad, surge la necesidad de optimizar los tratamientos térmicos, para de este modo poder ofrecer al consumidor un producto igual de estable y seguro, pero reduciendo la pérdida de componentes beneficiosos y aumentando el carácter de frescura que caracteriza al zumo de naranja. Esta necesidad ha propiciado la propuesta de métodos alternativos para reducir el daño térmico en el producto. Entre estas propuestas se encuentran, por ejemplo, el tratamiento con Altas Presiones Hidrostáticas (HHP), una tecnología ya adoptada por la industria como método de conservación de mínimo procesamiento (Tejada-Ortigoza et al., 2014). Otro método cada vez más utilizado son los Campos Eléctricos Pulsados (PEF), que en la actualidad es una de las tecnologías no térmicas de inactivación de microorganismos que está

alcanzando más interés comercial (Molés, 2012). La acidificación de los alimentos, junto con el posterior almacenamiento en refrigeración (5°C), permite reducir las temperaturas de tratamiento y también resulta una buena alternativa a los tratamientos clásicos (Peralta, 2019). Otra alternativa es el tratamiento con radiación ultravioleta (UV), que es un agente esterilizador natural y permite mejorar la calidad del producto excluyendo la necesidad de calor para eliminar los microorganismos. (Acurio et al.,2015).

Entre los métodos de mejora de los tratamientos térmicos, cabe destacar la optimización de los mismos mediante la búsqueda de la combinación de tiempo-temperatura que minimice la pérdida de factores de calidad, manteniendo la seguridad y estabilidad del producto final. El criterio principal respecto al cual se diseña la optimización de un tratamiento térmico es la función objetivo. Ésta mide la calidad de la solución y es la que hay que optimizar buscando un valor máximo o mínimo. Otro elemento son las variables de decisión, éstas corresponden a los valores de los cuales depende la función objetivo y que es necesario su ajuste. Y finalmente, se encuentran las restricciones, que limitan los valores posibles de las variables de decisión. Normalmente, como restricciones se suelen fijar unos límites mínimos para la letalidad del microorganismo indicador del alimento y/o de las enzimas que puedan llegar a causar deterioro en la calidad del alimento (Holdsworth et al., 2008)

Son numerosos los autores que han realizado estudios de todo tipo para optimizar los tratamientos térmicos (Agcam, 2014, Kim, 1999, Lee & Coates, 2003, Wicker & Temelli, 1988,). Gracias a estos estudios, son destacables los cambios que se han producido en el sector de zumos pasteurizados, ofreciendo mayor calidad y similitud al zumo de naranja natural.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este TFM es optimizar el tratamiento de pasteurización térmica en el zumo de naranja natural, para conseguir la inactivación de la flora microbiana presente, preservando su calidad. Para alcanzar este objetivo general, se propusieron los siguientes objetivos particulares:

1. Conocer los parámetros tiempo-temperatura utilizados en la pasteurización comercial de zumo de naranja natural y, de este modo, llevar a cabo la puesta a punto de un equipo de pasteurización de laboratorio. Con la información obtenida y el equipo de pasteurización en funcionamiento, llevar a cabo, de manera experimental, ensayos con tres niveles de inactivación de la flora microbiana presente en el zumo.
2. Realizar una búsqueda bibliográfica, para así, plantear y resolver un problema de optimización de tratamiento térmico de zumo de naranja. De este modo, se simula mediante la herramienta Excel, un proceso de pasteurización, en el que se buscan los parámetros tiempo-temperatura óptimos, para minimizar la pérdida de vitamina C al tratar el zumo de naranja. Se tiene que cumplir con las restricciones de eliminación del

99,999% de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Escherichia coli* O157:H7 y de la inactivación del 90% de la enzima Pectin-metil esterasa (PME).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de la muestra de zumo de naranja

Para la preparación del zumo de naranja se utilizó fruta fresca. Se emplearon naranjas (*Citrus sinensis*), de la variedad Navelate, la mitad de las naranjas se adquirieron en un mercado local y la otra mitad se obtuvieron de un campo propio. Primeramente, se pelaron las naranjas y se licuaron con una Licuadora Robot (Ultra Juicer, Robot Coupe J80, USA). Posteriormente el zumo obtenido se filtró utilizando un colador estándar de cocina, de este modo se obtuvo un zumo con la menor cantidad de sólidos suspendidos posible.

Para cada una de las experiencias se utilizaron unas 15 naranjas para obtener 2L de zumo de naranja. Puesto que el zumo que se requería era fresco, la extracción se realizó justo antes de iniciar el tratamiento.

3.2. Funcionamiento del pasteurizador

Para ello se dispuso de un pasteurizador de placas (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain) (Figura 1) y una bomba de alimentación peristáltica (Millipore Corporation, serie K92002058, Darmstadt, Alemania) para impulsar el zumo.



Figura 1. Pasteurizador de placas (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain)

En la Figura 2 se muestra el esquema con la disposición de los elementos del equipo de pasteurización. Cada una de las partes de éste se indica en el esquema mediante el nombre indicado por el fabricante. A lo largo del esquema se pueden observar ciertas marcas en forma de equis junto a un número, éstas corresponden a cada uno de los sensores de temperatura dispuestos a lo largo del pasteurizador, utilizados para la monitorización de la temperatura. Los utilizados para medir la temperatura en las experiencias llevadas a cabo fueron los sensores 2, 5, 6, 8, 9 y 10.

El funcionamiento del pasteurizador de placas es sencillo, éste funciona juntamente con un ordenador. A partir del ordenador se ponen en funcionamiento

cada una de las partes del pasteurizador, y además se monitoriza la temperatura de todos los puntos de éste.

El pasteurizador está compuesto por un tanque de agua caliente con el *interruptor de nivel AN -1* (figura 2), y la *resistencia AR-1* (figura 2). También se compone de la *bomba AB-2* (figura 2), encargada de que el agua caliente (representada por el color rojo) empiece a circular por el intercambiador de calor. El equipo cuenta con una entrada de agua fría (representada por el color azul) cuyo caudal se mide con el *sensor de caudal SC -2* (figura 2).

La muestra por tratar se introduce en el *tanque de alimentación*, y mediante la *bomba de alimentación AB-1* (figura 2) se impulsa hacia la sección central del pasteurizador, donde se encuentra el *intercambiador de placas*. En esta parte es donde se precalienta, pasteuriza y enfría el zumo (representado por el color gris claro). Finalmente, el zumo ya tratado se recoge del pasteurizador por la tubería dispuesta al extremo izquierdo de la figura 2.

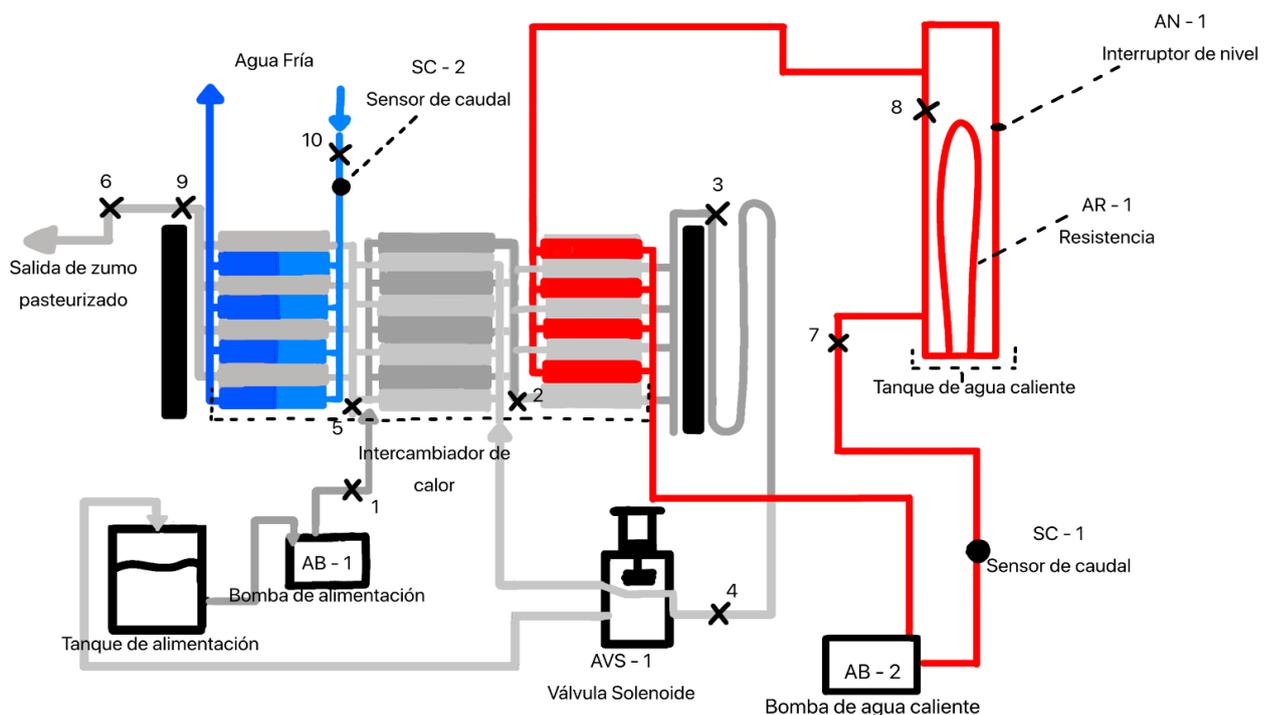


Figura 2: Diagrama del proceso y disposición de los elementos del equipo de pasteurización

3.3. Caracterización de los parámetros tiempo-temperatura del pasteurizador

Primeramente, se realizó una búsqueda bibliográfica, para así conocer los parámetros de tiempo/temperatura utilizados en la pasteurización de zumo de naranja comercial y los niveles de reducción microbiana obtenidos con estos tratamientos. Una vez conocidos los tiempos de residencia y las temperaturas empleadas en la industria, se procedió a seleccionar las temperaturas, los tiempos de residencia y caudales de cada uno de los tratamientos a utilizar en nuestro experimento. Para llevar a cabo la caracterización del pasteurizador se

utilizó agua como producto a tratar. La baja potencia del pasteurizador limitó la temperatura de tratamiento máxima, de este modo, no se pudo modificar en gran medida la temperatura de tratamiento mediante la modificación de la temperatura de la resistencia AR-1(figura 2). No obstante, modificando la velocidad de la bomba alimentación AB -1(figura 2), se consiguió regular el caudal del zumo de naranja y consecuentemente el tiempo de residencia del mismo, lo que permitió aumentar su temperatura. En definitiva, solo modificando la velocidad de la bomba AB-1(figura 2), se consiguió modificar la temperatura de tratamiento del pasteurizador y se pudieron realizar tres tratamientos de pasteurización distintos, uno más agresivo para inactivar totalmente la flora microbiana y otros dos para reducir la población microbiana a distintos niveles.

Para calcular los caudales y tiempos de residencia correspondientes a cada tratamiento, se midió el tiempo que tardaba en llenarse de muestra tratada una probeta graduada de 250 ml. Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los tratamientos. Así pues, mediante las ecuaciones 1 y 2 y conociendo los valores de sección (0,811 cm²) y longitud (340 cm) del tubo de mantenimiento del pasteurizador se calcularon el caudal (mL/min) y el tiempo de residencia (minutos), respectivamente.

$$Caudal = \frac{250 \text{ ml}}{\text{tiempo llenado probeta (min)}} \quad (1)$$

$$\text{Tiempo de residencia} = \frac{\text{longitud (cm)} * \text{sección (cm}^2\text{)}}{\text{caudal } \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right)} \quad (2)$$

3.4. Procedimiento del tratamiento térmico

Antes de realizar cada una de las experiencias a distinta temperatura y tiempo de residencia, fue necesario estabilizar el pasteurizador para que alcanzase la temperatura de tratamiento pertinente. Para ello se llevó a cabo el procedimiento de pasteurización, pero utilizando agua como muestra a tratar previamente a pasteurizar el zumo de naranja.

Primeramente, se aseguró mediante el interruptor de nivel AN-1(figura 2) que el tanque de agua caliente del pasteurizador estuviese completamente lleno y sin aire, para poder alcanzar la temperatura máxima en el depósito y consecuentemente la de tratamiento. Una vez lleno el tanque de agua caliente, se encendió (a temperatura constante de 95°C) la resistencia eléctrica AR-1(figura 2). Posteriormente, se accionó la bomba de agua caliente AB-2(figura 2), para iniciar la circulación del agua caliente por el intercambiador. A continuación, se procedió a introducir agua fría en el intercambiador de calor (2,5 L/min). Posteriormente, se activó la bomba auxiliar de alimentación AB-1(figura 2) a la apertura correspondiente, 30, 50 o 70, dependiendo del tratamiento que se quisiese aplicar al zumo, correspondiendo la apertura de bomba a 30 al tratamiento más agresivo y el de 70 al tratamiento más suave.

Seguidamente, se esperó unos 25/30 minutos a que las temperaturas de tratamiento se estabilizaran, y una vez alcanzada la estabilización del equipo,

se procedió a retirar el agua que estuviese en circulación y a introducir agua destilada previamente esterilizada, para así reducir al máximo la presencia de microorganismos no pertenecientes al zumo. Por último, cuando toda el agua esterilizada había salido del pasteurizador, se procedió a introducir la muestra a tratar (zumo de naranja) en el tanque de alimentación y se llevaba a cabo la pasteurización de este.

Se demostró que era necesario controlar de manera rigurosa la temperatura de entrada del zumo, ya que de ésta dependía en gran medida que se estabilizase correctamente el pasteurizador, además de ser necesaria para realizar las experiencias con repetitividad. En nuestras experiencias, se realizó un precalentamiento del zumo hasta 23°C.

Para asegurar la exactitud y la repetitividad de todos los tratamientos realizados con el pasteurizador, a lo largo de cada una de las experiencias, se mantuvo un riguroso control de los tiempos y las temperaturas de tratamiento. Previamente a introducir la muestra en el tanque de alimentación (figura 2), se mantuvo un control de las temperaturas de todas las zonas del intercambiador de calor mediante los sensores de temperatura 2, 5 y 9 (figura 2), de este modo, se aseguró que antes de empezar el tratamiento térmico, la temperatura del pasteurizador era la correcta para cada tratamiento. El mismo control de temperatura (mediante los sensores de temperatura 2, 5 y 9 (figura 2)) se llevó a cabo mientras se aplicó el tratamiento térmico, para asegurar que al zumo se le estaba aplicando la temperatura pertinente al tratamiento objetivo.

Para asegurar que el tiempo de tratamiento de zumo correspondía con el esperado según el tratamiento que se quería aplicar a éste, se cronometraba el tiempo que pasaba desde que se introducía el zumo hasta que salía tratado. De este modo, también se aseguraba que en todas las experiencias el tiempo de tratamiento era el correcto.

Con estas medidas se aseguró que al introducir el zumo el pasteurizador seguía estabilizado y que las temperaturas se mantenían constantes en el momento del tratamiento del zumo.

3.5. Toma de muestras

Para cada una de las experiencias de pasteurización se tomaron dos muestras de zumo. Para evitar la contaminación de la muestra de zumo tratado, se limpió previamente con etanol las superficies que iban a estar en contacto con el mismo.

En primer lugar, una vez filtrado el zumo, se procedió a tomar la muestra del zumo sin tratar. Para ello, se utilizó una micropipeta (SOCOREX Acura 825, 1 – 5mL, Suiza) automática, se tomaron 5 mL de muestra y se introdujeron en un tubo cónico falcon de 50 mL, el cual se dispuso en un matraz con hielo hasta el momento de la siembra.

La siguiente muestra tomada correspondía al zumo al cual se le aplicó el tratamiento térmico. Al recoger la muestra de zumo tratado, se verificó que las medidas de temperatura y tiempo indicadas en el apartado anterior eran las correctas, de este modo se aseguró que la muestra que se estaba recogiendo

fue tratada correctamente según los parámetros tiempo/temperatura asociados a la experiencia.

Para mejorar la repetitividad en los distintos tratamientos térmicos (apertura de bomba en 30, 50 y 70), cuando salía el zumo tratado del pasteurizador, se esperó 50, 40 y 30 s, respectivamente, antes de la toma de muestra. De este modo se permitió que el pasteurizador se estabilizase completamente y la variación de temperaturas en un mismo tratamiento fuese la mínima.

La muestra de zumo tratado se tomó directamente desde el flujo de zumo proveniente del equipo hasta el falcon de 50 mL el cual se disponía en un matraz con hielo hasta el momento de la siembra.

Una vez finalizado el muestreo, se procedió a limpiar el pasteurizador para evitar la proliferación de microorganismos, para ello se introdujo en el pasteurizador una disolución de un detergente-desinfectante industrial para superficies externas al 4% v/v (Diversey, Dellated, Barcelona). Posteriormente, se hizo circular por el sistema agua esterilizada.

3.6. Análisis microbiológico

Tanto la inactivación de levaduras y mohos como de mesófilos totales se determinaron mediante el método de siembra de superficie en placa. Cada una de las muestras se diluyó en serie con agua destilada, obteniéndose las diluciones 10 , 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . 100 μ L de cada una de las diluciones realizadas se sembraron por duplicado en medio PCA (Plate count Agar) e YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) para mesófilos totales, y para mohos y levaduras, respectivamente. Posteriormente las placas se incubaron durante 24h a 33 °C antes de realizar el recuento. Los resultados de inactivación se expresaron como $\log(N/N_0)$, donde N_0 es el número inicial de unidades formadoras de colonias (UFC) en la muestra de zumo sin tratar y N es el número de UFC en la muestra después de los diferentes tratamientos.

3.7. Procedimiento resolución problema de optimización

Para llevar a cabo la optimización de un proceso de pasteurización/esterilización hay que seguir los siguientes pasos:

1. Definir el objetivo/objetivos que se pretenden alcanzar con el tratamiento a aplicar.
2. Conocer la distribución y evolución de las temperaturas en el interior del producto, el zumo de naranja en este caso.
3. Posteriormente, conocer la cinética de destrucción de los distintos componentes considerados del zumo de naranja (microorganismos, los factores de calidad correspondientes, enzimas, etc.)
4. Aplicar un sistema de cálculo de baremos.
5. Seleccionar las condiciones óptimas de pasteurización/esterilización en relación al conjunto de los pasos anteriormente mencionados.

Para la resolución de un problema de optimización se hizo uso de una hoja de Excel y de la herramienta Solver.

3.8. Datos para el planteamiento y resolución del problema de optimización

Tanto para el planteamiento como para la resolución del problema de optimización térmica, se realizó una búsqueda bibliográfica de las constantes cinéticas de inactivación térmica (Valores D, Z) así como de las letalidades (F) recomendadas.

El valor D, o tiempo de reducción decimal, es el tiempo requerido a una temperatura T constante para destruir el 90% de las esporas o células vegetativas de un organismo o atributo dado (Rees y Bettison, 1994). El valor Z es el valor correspondiente al número de grados de temperatura necesarios para reducir en un ciclo logarítmico el valor de D. Los microorganismos más resistentes presentan un mayor valor de D. Por último, el valor $F_{T_{ref}}$ de la esterilización se define como el tiempo, a una temperatura constante (T_{ref}), al que es equivalente el tratamiento en cuestión (Juneja et al., 2001)

Los datos correspondientes a *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Escherichia coli* (O157:H7) (D, Z y el nº de reducciones decimales aplicado) fueron obtenidos de (Anapi et al., 2020). Los valores D y Z correspondientes a la vitamina C se obtuvieron a partir del estudio realizado por Heinrich et al. (2015). Y finalmente, los valores D y Z correspondientes a la enzima pectinmetilesterasa fueron obtenidos a partir de los estudios realizados por Tajchakavit, & Ramaswamy (1997) y Wicker & Temelli (1998).

3.9. Métodos de resolución de un problema de optimización a temperatura constante

En un problema de optimización a temperatura constante el zumo de naranja natural es calentado de forma muy rápida hasta alcanzar la "temperatura de proceso" (figura 3). De este modo, se considera despreciable efecto térmico que se produce en el intervalo hasta que se llega a la "temperatura de proceso". Finalmente, el zumo de naranja se mantiene a una temperatura constante durante el "tiempo de proceso" y posteriormente se enfría hasta la temperatura de salida del proceso, tampoco teniéndose en cuenta el efecto térmico producido en este intervalo.

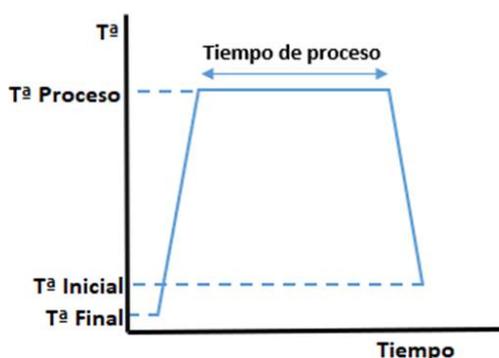


Figura 3: Perfil de temperaturas correspondiente a un tratamiento térmico a temperatura constante y con calentamiento instantáneo.

En un problema de optimización a temperatura constante, para calcular la letalidad del microorganismo problema se emplea el modelo de Bigelow, en el que se integra la tasa de letalidad ($L = 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}}$) durante el tiempo correspondiente al proceso (ecuación 3). Del mismo modo, en caso de que se quiera considerar el efecto del tratamiento térmico sobre algún factor de calidad (enzimas, vitaminas, etc.), se calcula el valor cocción C (ecuación 4).

$$F = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} dt \implies F = 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} t \quad (3)$$

$$C = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} dt \implies C = 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} t \quad (4)$$

Donde T es la temperatura de proceso, t el tiempo de proceso, T_{ref} la temperatura de referencia y Z la constante cinética.

Para la resolución de los problemas de optimización, se puede utilizar tanto el método gráfico como el método analítico, a continuación, se explica cada uno de estos métodos.

Método gráfico de optimización

Mediante este método se representa de manera gráfica la función objetivo del problema frente a las variables de decisión planteadas. De este modo, se deduce el resultado máximo (óptimo) teniendo en cuenta las restricciones del problema.

Para la resolución del problema de optimización mediante el método gráfico se aplican los logaritmos decimales a las ecuaciones 3 y 4, obteniendo las ecuaciones 5-7.

$$\log t \geq -\frac{T}{z} + T \frac{T_{ref}}{z} + \log F_{max} \quad (5) \quad \left. \vphantom{\log t} \right\} \text{Microorganismos}$$

$$\log t \geq -\frac{T}{z} + T \frac{T_{ref}}{z} + \log C_{max\text{enzima}} \quad (6) \quad \left. \vphantom{\log t} \right\} \text{Enzimas, vitaminas, color, textura...}$$

$$\text{Función objetivo: } \log t = -\frac{T}{z} + T \frac{T_{ref}}{z} + \log C_{vit} \quad (7)$$

Mediante la ecuación 7 se representa la función objetivo, en cambio, mediante las inecuaciones (5 y 6) se representan las restricciones. De este modo, mediante la combinación de los parámetros tiempo – temperatura se maximiza la función objetivo.

Las ecuaciones anteriormente mencionadas se representan gráficamente con los ejes "logaritmo de tiempo" y "temperatura" (figura 4) resultando rectas

de pendiente (-1/z). Dependiendo del valor de cocción (C) variará la ordenada en el origen de la función objetivo. Las restricciones del problema se representan gráficamente mediante las inecuaciones 5 y 6, en la gráfica se representan mediante la recta azul (microorganismos) y naranja (enzima). Estas delimitan las zonas posibles y no posibles del problema. De este modo, la optimización gráfica de este problema consiste en buscar un punto por el que pasa la recta correspondiente a la función objetivo de mínima ordenada en el origen, dentro de la zona posible, teniendo en cuenta las restricciones

Método analítico de optimización

El método analítico de resolución del problema de optimización (ecuaciones 3-4, variables de decisión y restricciones) se realizó empleando la herramienta Solver, de la hoja de cálculo Excel.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los tratamientos térmicos

Después de la realización de múltiples experiencias a distintos caudales y tiempos de residencia, se decidió que los tratamientos que más se ajustaban al objetivo de llevar a cabo tres ensayos a distintos niveles de inactivación eran los siguientes:

-Ajuste de la bomba en posición 30 (correspondiente a caudal de 8 mL/min) para la inactivación total de la flora presente en el zumo.

-Ajuste de bomba en posición 50 (10 mL/min) y 70 (17 mL/min) para la inactivación de la flora microbiana a distintos niveles.

La temperatura de cada tratamiento, los tiempos de residencia y caudales de cada uno de los tratamientos se muestran a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de apertura de bomba, caudal (mL/min), temperatura (°C) y tiempo (s) para cada uno de los tratamientos térmicos utilizados.

Apertura de bomba	Caudal (mL/min)	Temperatura de tratamiento (°C)	Tiempo de residencia (s)
70	17	67±2,5	16±0,6
50	10	75,5±1,6	28±1,2
30	8	83,4±0,5	53±0,5

Se decidió trabajar con los caudales de bomba de alimentación de zumo indicados porque la intensidad de los tratamientos conseguidos distaba lo suficiente entre ellos y, además, eran las condiciones en las que mejor se estabilizaban las temperaturas del pasteurizador.

Las temperaturas y los tiempos de tratamiento indicados en la tabla representan los valores promedio y la desviación estándar de las tres repeticiones que se realizaron para cada uno de los tres tratamientos.

4.2. Inactivación de microorganismos

En las tablas 2 y 3 se indican las reducciones logarítmicas de microorganismos obtenidas con la aplicación de cada tratamiento de pasteurización, junto a las condiciones empleadas en cada caso.

Los datos mostrados en la tabla 2 se corresponden a los tratamientos aplicados al zumo obtenido de las naranjas adquiridas del mercado local. Por otra parte, los datos mostrados en la tabla 3 se corresponden a las naranjas obtenidas del campo.

En ambas tablas solo se muestra una repetición para cada tratamiento térmico y tipo de naranja, no obstante, se llevaron a cabo más repeticiones, aunque debido a errores durante el tratamiento y la siembra no se pudo realizar el recuento de microorganismos y en consecuencia el cálculo de reducciones logarítmicas.

Tabla 2: Inactivación de mohos y levaduras y mesófilos totales bajo diferentes condiciones de tratamiento térmico en zumo de naranjas comerciales.

Apertura de bomba	Caudal (ml/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (s)	Reducciones logarítmicas	Microorganismos
70	16,8	66,1	16,43	-1,27	Mohos y levaduras
				-1,98	Mesófilos totales
50	10	74,4	27,35	-0,99	Mohos y levaduras
				-1,61	Mesófilos totales
30	8	83,2	53,8	*	Mohos y levaduras
				*	Mesófilos totales

*Valor de reducción logarítmica no obtenido debido a la contaminación de la muestra estudio.

Tabla 3: Inactivación de mohos y levaduras y mesófilos totales bajo diferentes condiciones de tratamiento térmico en zumo de naranjas obtenidas del campo.

Apertura de bomba	Caudal (ml/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (s)	Reducciones logarítmicas	Microorganismos
70	16,8	65,2	16,43	-0,58	Mohos y levaduras
				-0,31	Mesófilos totales
30	8	83	53,8	-0,7	Mohos y levaduras
				-0,32	Mesófilos totales
50	10	77,9	27,35	-0,37	Mohos y levaduras
				-0,05	Mesófilos totales

Los resultados se han expresado en dos tablas debido a la diferencia de los valores de inactivación microbiana. En principio se pensó que el uso de naranjas de distinto origen no afectaría en gran medida a los resultados de inactivación.

No obstante, una vez realizados los tratamientos térmicos y calculadas las correspondientes reducciones logarítmicas, se demostró la gran influencia del distinto origen de la materia prima. La población inicial presente en el zumo obtenido a partir de naranjas recolectadas del campo se situó en el rango de 10^4 - 10^5 UFC/mL tanto para los mesófilos totales como para las levaduras y mohos. En cambio, para el zumo obtenido a partir de naranjas del supermercado el recuento estuvo en el rango de 10^3 - 10^4 UFC/mL.

En el estudio realizado por Bull et al. (2004) la población inicial de bacterias mesófilas viables en zumo fresco se situó entre 10^3 - 10^5 UFC/mL, incluso hasta 10^8 en algunos casos. Para levaduras y mohos, los recuentos fueron de 10^3 - 10^5 UFC/mL. Así pues, los valores de población microbiana inicial hallados en el presente estudio se encuentran dentro de los valores típicos.

Viendo que las poblaciones iniciales de microorganismos son similares en ambos grupos de naranjas (recolectadas y compradas), se descartó que la diferencia de valores de inactivación se debiese a la mayor carga de microorganismos de las naranjas recolectadas directamente del campo. De este modo, se pensó que esta diferencia se pudo deber a que la flora microbiana presente en las naranjas recolectadas del campo podría ser distinta a la presente en las naranjas compradas del supermercado. Así pues, los microorganismos presentes en cada grupo de naranjas podrían presentar distinta resistencia a los tratamientos térmicos aplicados.

Una vez calculada la reducción logarítmica de los tratamientos planteados, los resultados obtenidos mostraron que, tanto para levaduras y mohos, como para mesófilos totales, no se consiguió la inactivación deseada. Se obtuvo una reducción logarítmica de población microbiana en el rango 1,98-0,05 log UFC/mL. Las regulaciones de la FDA exigen un requisito mínimo de pasteurización de 5 log de reducción de microorganismos patógenos capaces de crecer en el producto (FDA, 2004). Así pues, por ejemplo, para una temperatura de pasteurización instantánea típica de 80°C, los productos con pH <4.4 requerirán 0,2 s para obtener una reducción de 5 log de *E. coli* 0157: H7 y *Salmonella spp* (Toledo et al., 2007).

Según la FDA, se recomienda un tratamiento mínimo de temperatura-tiempo equivalente de 71.1 °C durante 3 s para los productos con un pH en el rango de 3-3,4. En otros estudios, como por ejemplo el realizado por Timmermans et al. (2011) se utilizó un tratamiento de 72°C durante 20 s para llevar a cabo la pasteurización de zumo de naranja fresco y se consiguió reducir la población microbiana a niveles por debajo del límite de detección. En el estudio llevado a cabo por Parish (2008) se utilizaron dos tratamientos térmicos, 98°C durante 10 s (tratamiento tradicional) y 75°C durante 10 s (tratamiento mínimo), en ambos también se consiguió reducir la población microbiana por debajo del límite de detección. En un estudio reciente realizado por Anapi et al. (2020), se pudo demostrar que, aplicando temperaturas de 60°C, las levaduras se inactivaron en menos de 0,1 min. No obstante, las levaduras estudiadas en este caso fueron inoculadas en el zumo de naranja, al contrario que en el presente estudio, donde se ha inactivado la microbiota presente en el zumo recién exprimido. En este sentido, Anapi et al. (2020) sugirieron que la resistencia de las levaduras al calor depende en gran medida de las variaciones entre especies e intraespecies de estas.

De los resultados obtenidos (tablas 3 y 4), se puede concluir que el objetivo de inactivar la población microbiana presente en el zumo de naranja fresco no se consiguió. Además, se esperaba que la inactivación microbiana fuese mayor en los tratamientos en los cuales la temperatura y el tiempo de tratamiento fueran más elevados, para así inactivar a distintos niveles la población microbiana. No obstante, los resultados no mostraron ningún tipo de correlación entre la intensidad del tratamiento y la inactivación microbiana.

Así pues, la hipótesis más probable es que durante algún punto del tratamiento térmico, muestreo o siembra se contaminase la muestra, y de este modo, las reducciones logarítmicas de microorganismos fuesen menores de lo esperado.

Además, debido a los problemas y a las restricciones derivadas por la Covid-19, no fue posible continuar con las experiencias presenciales en el laboratorio.

4.3. Resolución problema de optimización térmico

Se planteó optimizar el tratamiento de zumo de naranja natural considerando tres compuestos (microorganismo, enzima y vitamina). El supuesto tratamiento se llevaría a cabo en un pasteurizador de placas en el que el calentamiento es instantáneo (en cuanto a letalidad y cocción solamente se considerará la fase de calentamiento).

Se consideraron dos supuestos, uno en el que el microorganismo a eliminar es *Alicyclobacillus acidoterrestris* (A) y otro en el que el microorganismo problema es *Escherichia coli* O157:H7 (B), para ambos se planteó una reducción del 99,999%. Para ambos supuestos se consideró como enzima la Pectin-metil esterasa (90% de reducción) y como vitamina, la Vitamina C.

En ambos supuestos se persiguió el mismo objetivo, minimizar la pérdida de Vitamina C asegurando las reducciones planteadas para el microorganismo problema y la enzima.

Tabla 4: Datos cinéticos (obtenidos de las fuentes referidas en el apartado de M&M).

	Z (°C)	D95 (min)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (A)	7,33	2,36
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (B)	6	4,40E-07
Pectin-metil esterasa	10,8	0,19
Vitamina C	90,09	8,26

En este supuesto, el perfil de temperaturas con el tiempo se supone constante tal y como se mostraba en la figura 3. Para que se cumplan las restricciones de reducción de la población de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (A) y *Escherichia coli* O157:H7 (B) en un 99,999% y de la enzima Pectin-metil esterasa en un 90%, teniendo en cuenta los valores de reducción decimal (D) mostrados en la tabla 4 y una Tref de 95°C, los valores de letalidad para los microorganismos y el valor de cocción para la enzima deben cumplir que:

$$(A) \quad F_{A.Acidoterrestris} = \log \frac{N_0}{N} D_{mic} \geq 10,8 \text{ min} \quad (8)$$

$$C_{enz} = \log \frac{C_0}{C} D_{enz} \geq 0,19 \text{ min} \quad (9)$$

$$(B) \quad F_{E.Coli} = \log \frac{N_0}{N} D_{mic} \geq 2,20E - 06 \text{ min} \quad (10)$$

$$C_{enz} = \log \frac{C_0}{C} D_{enz} \geq 0,19 \text{ min} \quad (11)$$

Teniendo en cuenta que la temperatura permanece constante durante todo el tratamiento, las ecuaciones que permiten calcular la letalidad para los microorganismos *Alicyclobacillus acidoterrestris* (A) y *Escherichia coli* O157:H7 (B) y los valores de cocción para la enzima (restricciones) y la vitamina (función objetivo), se resuelven de la siguiente forma:

$$C_{Vit} = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{vit}}} dt \quad \Longrightarrow \quad C_{Vit} = 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{vit}}} t \quad (12)$$

$$F_{A.Acidoterrestris} = 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{A.A}}} t \geq 10,8 \quad (13) (A)$$

$$F_{mic} = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{mic}}} dt \quad \Longrightarrow \quad F_{E.Coli} = 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{E.Coli}}} t \geq 2,20E - 06 \quad (14) (B)$$

$$C_{enz} = \int_{t_0}^{t_f} 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{enz}}} dt \quad \Longrightarrow \quad C_{enz} = 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z_{enz}}} t \geq 0,19 \quad (15)$$

Dando lugar a dos inecuaciones (para cada supuesto, A y B) correspondientes a las dos restricciones y una ecuación que representa la función objetivo.

4.3.1. Método gráfico

Para la resolución gráfica se aplican logaritmos decimales en ambos miembros de la ecuación e inecuaciones anteriores quedando:

$$\text{Función objetivo: } \log t = -\frac{T}{z_{vit}} + \frac{T_{ref}}{z_{vit}} + \log C_{\max vit} \quad (16)$$

$$\log t \geq -\frac{T}{z_{A.A}} + \frac{T_{ref}}{z_{A.A}} + \log (10,8) \quad (17) \text{ (A)}$$

$$\log t \geq -\frac{T}{z_{E.Coli}} + \frac{T_{ref}}{z_{E.Coli}} + \log (2,20E - 06) \quad (18) \text{ (B)}$$

$$\log t \geq -\frac{T}{z_{enz}} + \frac{T_{ref}}{z_{enz}} + \log (0,19) \quad (19)$$

En el método gráfico se representa el logaritmo decimal del tiempo frente a la temperatura para las dos inecuaciones de cada supuesto (17(A), 18(B) y 19). Las rectas correspondientes se muestran en las figuras 4 y 5 (expresando el tiempo en una escala logarítmica). En estas figuras también se muestran distintos valores de la ordenada en el origen de la función objetivo (ecuación 16), que se corresponden a distintos porcentajes de retención de vitamina C.

En las figuras 4 y 5 las soluciones posibles deben estar por encima de las rectas que representan las restricciones, delimitando por lo tanto éstas un área que comprende todas las posibles combinaciones que cumplen las restricciones.

En la figura 4 se muestra que el tratamiento térmico con el que más retención de vitamina C se consigue (99,56%), cumpliendo la reducción del 99,999% de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e inactivación del 90% de la enzima la Pectin-metil esterasa, es el correspondiente a $\log 10^{-0,98}$ (0,11 min) y 110°C (considerando ésta como la máxima temperatura aplicable). La restricción de temperaturas que se aplicó para este supuesto fue de 60 a 110°C. La temperatura máxima seleccionada fue mayor que la temperatura común de pasteurización (95-98°C) porque se trató de conseguir la máxima retención de vitamina C posible.

Observando la figura 4 se puede determinar que mediante un tratamiento ordinario de pasteurización de zumo de naranja no se pueden cumplir las restricciones planteadas, obteniendo una retención alta de la vitamina C, ya que para obtener una retención de más del 90% se tienen que aplicar temperaturas de más de 100°C, las cuales corresponden a tratamientos de esterilización. Por otra parte, tampoco resulta factible aplicar tratamientos más suaves, ya que se obtienen retenciones de vitamina C más bajas (80-30%) y los tiempos de tratamiento térmico aumentan en gran medida (6-30 min). Puesto que la resistencia térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* es tan elevada, el pasteurizador de placas (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain) (figura 1) no resulta útil para la inactivación de este microorganismo ya que a 83°C (máxima T^a alcanzada en el pasteurizador) harían falta 512,23 min y se reduciría la concentración de vitamina C a 0,0023%.

En este caso, la inactivación de *A. Acidoterrestris* resulta más restrictiva que la inactivación de la enzima PME, como se puede observar en la figura 4, de este modo, los tratamientos térmicos deben centrarse en la eliminación de este microorganismo, ya que si se asegura la eliminación de este también se cumplirá con la inactivación de la enzima.

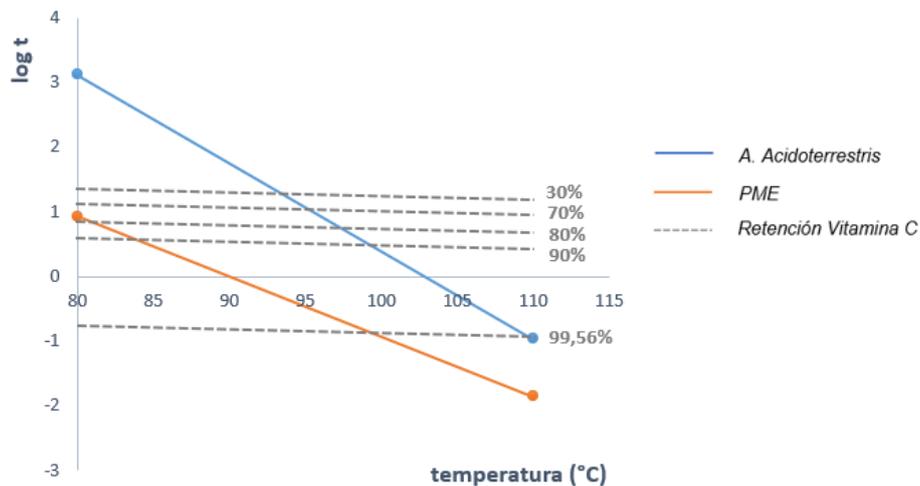


Figura 4: Representación de las restricciones (99,999% de inactivación de *A. Acidoterrestis* y 90% de PME) y función objetivo (vitamina C) en el tratamiento térmico de zumo de naranja.

En cambio, en la Figura 5 se muestra que aplicando un tratamiento térmico correspondiente a $\log 10^{-0,84}$ (0,14 min) y 98°C (considerando ésta como la máxima temperatura aplicable) se retiene un 99,45% de vitamina C, cumpliendo la reducción del 99,999% de *Escherichia coli* O157:H7 e inactivación del 90% de la enzima la Pectin-metil esterasa. Este tratamiento si se corresponde a un tratamiento de pasteurización ordinario. Por este motivo, al contrario que en el supuesto A, se seleccionó un rango de temperaturas de entre 60-98°C, ya que, por la bibliografía consultada, se sabía previamente que tanto la enzima PME como el microorganismo *E.Coli* se podían inactivar con tratamientos de pasteurización ordinarios.

El pasteurizador de placas (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain) (Figura 1) podría resultar útil para la inactivación de este microorganismo y enzima a los niveles planteados en el problema, no obstante, se alcanzarían retenciones de vitamina C más bajas, puesto que la temperatura máxima alcanza con este fue menor y además los tiempos de tratamiento deberían de ser más elevados. De este modo, con este pasteurizador, se podría conseguir como máximo una retención de vitamina C del 91,16%, aplicando un tratamiento térmico de 83°C durante 4,43 min, lo que exigiría modificar el tubo de mantenimiento para aumentar el tiempo de residencia que con la configuración actual es menor de 54 s (tablas 2 y 3).

La inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 resulta menos restrictiva que la inactivación de la enzima PME, como se puede observar en la figura 5. De este modo, al aplicar un tratamiento térmico en el zumo de naranja, asegurando la inactivación de la enzima PME, se asegura la eliminación de este microorganismo.

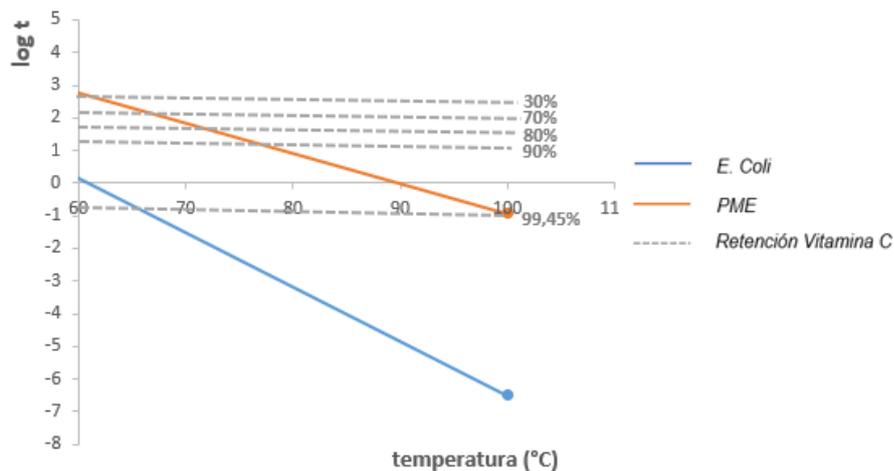


Figura 5: Representación de las restricciones (99,999% de inactivación de E.Coli y 90% de PME) y función objetivo (vitamina C) en el tratamiento térmico de zumo de naranja.

De las figuras 4 y 5 se puede observar que a mayor temperatura y menor tiempo de tratamiento se consigue una mayor retención de vitamina manteniendo los niveles de inactivación de microorganismos y enzimas planteados.

4.3.2. Método analítico

Para realizar la optimización analítica se utiliza la hoja de cálculo Excel introduciendo las ecuaciones 12 (Cvit), 13 (*Fa.acidoterrestris*) (A), 14 (*Fe.coli*) (B) y 15 (Cenz) en tres celdas (figuras 6 y 7). En dos celdas adicionales se introducen dos valores iniciales para la temperatura y el tiempo. En una última celda se calcula el porcentaje de retención. Los rangos de temperatura límite utilizados fueron los mismos que los especificados en el método gráfico.

SOLVER	
Tiempo	0,106574317
Tº	110
Fmic	11,83333335
Cenz	2,609404745
Cvit	0,156369678
% Retención	99,5578849

Figura 6: (A). Hoja de cálculo para la optimización analítica del tratamiento térmico de zumo de naranja cumpliendo la reducción del 99,999% de A. Acidoterrestris e inactivación del 90% de PME.

SOLVER	
Tiempo	0,1812544
Tº	98
Fmic	0,573176739
Cenz	0,343610427
Cvit	0,195698976
% Retención	99,44699435

Figura 7: (A). Hoja de cálculo para la optimización analítica del tratamiento térmico de zumo de naranja cumpliendo la reducción del 99,999% de E.Coli O157:H7 e inactivación del 90% de PME.

El problema consiste en aplicar la herramienta Solver de la hoja de cálculo Excel, para obtener la combinación de tiempo-temperatura que maximice la función

objetivo, introduciendo las restricciones: $F_{a.acidoterrestris} > 10,8$ y $C_{enz} > 0,19$ para el supuesto A (Figura 6) y $F_{e.coli} > 2,20E-06$ y $C_{enz} > 0,19$ para el supuesto B (Figura 7). Los valores optimizados coinciden con el método gráfico.

5. CONCLUSIONES

Los experimentos llevados a cabo no consiguieron el objetivo principal del estudio, inactivar la población microbiana presente en el zumo de naranja fresco. Teniendo en cuenta que el tratamiento más severo aplicado fueron 83°C durante 53,8 s, se tendría que haber conseguido una inactivación de la flora microbiana mucho más elevada. Además, no se observó ningún tipo de relación entre la severidad del tratamiento térmico y la inactivación microbiana.

Las posibles causas de que no se haya conseguido la inactivación deseada podrían ser varias; una posible causa es que la muestra tratada, a pesar de haber tomado medidas de precaución, se haya contaminado antes de la siembra. El zumo tratado podría haberse contaminado en alguna parte del pasteurizador que no hubiese sido limpiada correctamente o incluso en el recipiente en el cual era recolectado una vez tratado. Otra posible causa es que debido a las fluctuaciones que se producían en la temperatura de tratamiento del pasteurizador, los tratamientos aplicados no fuesen homogéneos y, por lo tanto, el tratamiento térmico aplicado a parte del zumo fuese más suave.

En cuanto al problema de optimización térmico, se pudo determinar que los tratamientos de pasteurización ordinarios no son lo suficientemente severos para reducir la población de *A. Acidoterrestris* a los niveles requeridos para la conservación correcta del zumo, así pues, sería necesario aplicar tratamientos de esterilización. Además, a partir de ambos supuestos, se concluyó que la retención de vitamina C tiende a aumentar cuando se aplican tratamientos térmicos más cortos y de mayor temperatura, obteniendo de este modo un zumo de naranja con mejores cualidades nutricionales.

BIBLIOGRAFÍA

- ACURIO, L., JOSÉ, J. V., SALAZAR, D., PÉREZ, L., & VALENCIA, A. (2015). Efecto de la temperatura y radiación ultravioleta de onda corta en el contenido de ácido L-ascórbico en zumo de naranja (*Citrus sinensis*). *Alimentos Hoy*, 23(36), 75-87.
- AGCAM, E., AKYILDIZ, A., & EVRENDILEK, G. A. (2014). Effects of PEF and heat pasteurization on PME activity in orange juice with regard to a new inactivation kinetic model. *Food chemistry*, 165, 70-76.
- ANAPI, G. R., ABA, R. P. M., & GABRIEL, A. A. (2020). Screening for heat-resistant

- reference yeast isolate in orange juice. *Food Microbiology*, 94, 103639
- BAKER, R. A., & CAMERON, R. G. (1999). Clouds of citrus juices and juice drinks. *Food technology* (Chicago), 53(1), 64-69
- BEAVENS, E. A., BISSETT, O. W., & KELLER, J. G. (1962). Chemical technology of citrus products. *Agricultural handbook* (Vol. 98). Washington, DC.
- BROWN, M. G. (2004). World orange-juice production and consumption trends (No. 823-2016-54550).
- BULL, M. K., ZERDIN, K., HOWE, E., GOICOECHEA, D., PARAMANANDHAN, P., STOCKMAN, R., ET AL. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 135–149
- CORTÉS, C., ESTEVE, M. J., & FRÍGOLA, A. (2008). Color of orange juice treated by high intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food control*, 19(2), 151-158.
- EIROA, M. N. U., JUNQUEIRA, V. C. A., & SCHMIDT, F. L. (1999). Alicyclobacillus in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*, 62(8), 883-886.
- FDA (2004). Guidance for industry: Juice HACCP hazards and controls guidance Final Guidance, March 3, 2004 (First ed). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/>
- FRY, J., MARTIN, G. G., & LEES, M. (1995). Authentication of orange juice. In *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages* (pp. 1-52). Springer, Boston, MA. [GuidanceDocuments/Juice/ucm072557.htm](http://www.fda.gov/oc/ohrt/GuidanceDocuments/Juice/ucm072557.htm)
- HEINRICH, V., ZUNABOVIC, M., BERGMAIR, J., KNEIFEL, W., & JÄGER, H. (2015). Post-packaging application of pulsed light for microbial decontamination of solid foods: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 145-156.
- HOLDSWORTH, S. D., SIMPSON, R., & BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. (2008). *Thermal processing of packaged foods* (Vol. 284). New York, NY: Springer.
- JOHNSON, T. (2001). La producción de zumo de cítricos y la aplicación de tecnología al mercado de productos frescos. *Simposiom sobre los Cítricos China/FAO*.
- JUNEJA, V. K., EBLEN, B. S., & RANSOM, G. M. (2001). Thermal inactivation of *Salmonella spp.* in chicken broth, beef, pork, turkey, and chicken: Determination of D- and Z-values. *Journal of Food Science*, 66(1), 146-152.
- KIM, H. B., TADINI, C. C., & SINGH, R. K. (1999). Effect of different pasteurization conditions on enzyme inactivation of orange juice in pilot-scale experiments 1. *Journal of food process engineering*, 22(5), 395-403.
- KIMBALL, D. A. (2012). *Citrus processing: a complete guide*. Springer Science & Business Media.
- LEE, H. S., & COATES, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange

- juice color and pigments. *LWT-Food Science and Technology*, 36(1), 153-156.
- MARCO MOLÉS, R. (2012). Impacto de Nuevas Tecnologías de Conservación Sobre La Estructura y Los Principales Componentes Químicos de Alimentos Fluidos (Doctoral dissertation).
- MAZZOTTA, A. S. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of food protection*, 64(3), 31-320.
- MC ALLISTER, J. W. (1980). Methods for determining the quality of citrus juice. In S. Nagy & J. A. Attaways (Eds.), *Citrus nutrition and quality* (Vol. 143, pp. 291–317). ACS symposium series. Washington, DC.
- MEZA, A., & NANCY, E. (2011). Estudio de la cinética de degradación térmica del ácido ascórbico durante la pasteurización del zumo de naranja valencia (*Citrus sinensis*).
- MOODY, V. (2003). Thermal inactivation kinetics of *Escherichia coli* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice (Doctoral dissertation, University of Florida).
- OCU (2020). Organización de consumidores y usuarios. Zumos de naranja envasados: ¿sabes qué compras?. Dirección URL: <https://www.ocu.org/alimentacion/alimentos/informe/zumos-ensados> [Fecha de consulta: 25/4/2020]
- PARISH, M. E. (1998). Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure. *LWT-Food Science and Technology*, 31(5), 439-442.
- PERALTA PÉREZ, A. (2019). Aplicación de métodos combinados para aumentar la vida útil del jugo de naranja (Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- POLYDERA, A. C., GALANOU, E., STOFOROS, N. G., & TAOUKIS, P. S. (2004). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 291-298.
- RINGBLOM, U. (ED.). (2017). *The orange book*. Tetra Pak Processing Systems.
- ROUSEFF, R. L., RUIZ PEREZ-CACHO, P., & JABALPURWALA, F. (2009). Historical review of citrus flavor research during the past 100 years. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8115-8124. DOI: 10.1021/jf90123a024
- SHOMER, R., COGAN, U., & MANNHEIM, C. H. (1994). Thermal death parameters of orange juice and effect of minimal heat treatment and carbon dioxide on shelf-life. *Journal of food processing and preservation*, 18(4), 305-315.
- SÍSTER, P. S., ESPARZA, E. T., & LAMBÁN, I. R. (1996). Reflexiones en torno a la citricultura española. *Revista española de economía agraria*, (175), 229-248.
- STATISTA (2018). Volumen de naranjas producidas al año en el mundo desde 2011 hasta 2018(en miles de toneladas). Dirección URL: <https://es.statista.com/estadisticas/508983/produccion-mundial-de-naranjas/#:~:text=Esta%20estad%C3%ADstica%20recoge%20los%20datos,los%205%20millones%20de%20toneladas.> [Fecha de consulta: 30/10/2020]

- TAHIRI, I., MAKHLOUF, J., PAQUIN, P., & 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(1), 98-105.
- TAJCHAKAVIT, S., & RAMASWAMY, H. S. (1997). Thermal vs. Microwave inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice under batch mode heating conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 30(1), 85-93
- TEJADA-ORTIGOZA, V. A., ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z., VALDEZ-FRAGOSO, A., MÚJICA-PAZ, H., & WELTI-CHANES, J. (2014). Cinética de inactivación de pectin metilesterasa en triturado de naranja por medio de altas presiones hidrostáticas y temperatura. *Cibia*, 93.
- TIMMERMANS, R. A. H., MASTWIJK, H. C., KNOL, J. J., QUATAERT, M. C. J., VERVOORT, L., VAN DER PLANCKEN, I., ... & MATSER, A. M. (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. *Innovative food science & emerging technologies*, 12(3), 235-243.
- TOLEDO, R. T., SINGH, R. K., & KONG, F. (2007). *Fundamentals of food process engineering* (Vol. 297). New York, NY: Springer.
- TRIBESS, T. B., & TADINI, C. C. (2006). Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9), 1328-1335.
- VAN DEN BROECK, I., LUDI KHUYZE, L. R., VAN LOEY, A. M., & HENDRICKX, M. E. (2000). Inactivation of orange pectinesterase by combined high-pressure and-temperature treatments: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1960-1970.
- WEISSMAN, S. (1973). *Magazine circulation recordkeeping aid: a manual to aid in the preparation and compilation of data for filing ABC Magazine Publisher's Statements*. Circular Publication 703016156. Chicago, Toronto: ABC.
- WICKER, L., & TEMELLI, F. (1988). Heat inactivation of pectinesterase in orange juice pulp. *Journal of Food Science*, 53(1), 162-164.