

## RESUM

La indústria alimentària, en resposta a la demanda per part dels consumidors d'aliments naturals, frescos i lliures de conservants químics, ha desenrotllat tecnologies de conservació no tèrmiques. El CO<sub>2</sub> supercrític (SC-CO<sub>2</sub>), representa una tecnologia no tèrmica d'inactivació prometedora, ja que està encaminada a produir el mínim impacte sobre les propietats nutricionals i organolèptiques dels aliments. No obstant, en alguns casos es requereixen condicions de pressió o temperatura elevades, així com tractaments excessivament llargs per a garantir la seguretat i estabilitat dels aliments. En este sentit, amb l'objectiu d'obtenir la letalitat requerida utilitzant processos més curts o de menor intensitat, en el present treball s'ha desenrotllat una combinació del SC-CO<sub>2</sub> amb ultrasons de potència (HPU) i de SC-CO<sub>2</sub> amb altes pressions hidrostàtiques (HHP), que ha sigut empleada per a processos d'inactivació microbiana i enzimàtica.

L'objectiu principal de la present Tesi va ser avaluar tecnologies no tèrmiques de conservació basades en la combinació de SC-CO<sub>2</sub> i HPU, i en la combinació de SC-CO<sub>2</sub> i HHP. Respecte a la combinació de SC-CO<sub>2</sub> amb HPU, es va estudiar la influència de l'estat de creixement de les cèl·lules, de les condicions del procés, de la naturalesa del midi i de l'ús o no de HPU, sobre les cinètiques d'inactivació de microorganismes (*Escherichia coli* (*E. coli*) i *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)) i enzims (pectin-metil-esterasa (PME)). Es van emprar models matemàtics i tècniques de microscòpia per a descriure les cinètiques i els mecanismes d'inactivació, respectivament. Respecte a la combinació de SC-CO<sub>2</sub> i HHP, es va determinar l'efecte de diferents nivells de CO<sub>2</sub> sobre l'eficàcia del tractament amb HHP per a inactivar PME, peroxidasa (POD) i polifenol oxidasa (PPO).

Es va estudiar la influència de l'estat de creixement de les cèl·lules de *E.coli* i *S. cerevisiae* inoculades en medi de cultiu, LB i YPD Broth, respectivament, sobre

les seues cinètiques d'inactivació amb SC-CO<sub>2</sub>. Cultius individuals de *E. coli* i *S. cerevisiae* es van incubar fins que les cèl·lules van aconseguir quatre estats de creixement diferents, des de la fase primerenca exponencial fins a la fase estacionària, per a posteriorment ser tractades amb SC-CO<sub>2</sub> a 350 bar i 35 °C. Es va comparar el procés combinat de SC-CO<sub>2</sub>+HPU amb el tractament de SC-CO<sub>2</sub> per a avaluar l'efecte dels HPU sobre les cinètiques d'inactivació amb SC-CO<sub>2</sub> de *E. coli* i *S. cerevisiae* en la fase primerenca estacionària inoculades en medis de cultiu, i es va determinar l'efecte de diferents temperatures (31-41 °C, 225 bar) i pressions (100-350 bar, 36 °C). Amb l'objectiu de conèixer els mecanismes d'inactivació associats a esta tecnologia combinada (SC-CO<sub>2</sub>+HPU) es va realitzar un estudi morfològic. Es van estudiar les diferències entre cèl·lules de *E. coli* i *S. cerevisiae* no tractades, tractades amb SC-CO<sub>2</sub> (350 bar, 36 °C, 5 min) i amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU (350 bar, 36 °C, 5 min, 40 W) emprant microscòpia òptica (LM) i microscòpia electrònica de transmissió (TEM). Es va seleccionar el suc de poma i de taronja per a estudiar la inactivació d'ambdós microorganismes en matrius reals; a més, es va estudiar la inactivació de l'enzim pectin-metil-esterasa (PME) del suc de taronja. Les experiències es van dur a terme a diferents temperatures (31-41 °C, 225 bar) i pressions (100-350 bar, 36 °C). Les condicions de temperatura i pressió seleccionades superen el punt crític del CO<sub>2</sub> i són menors que les condicions letals per a ambdós microorganismes. Tant *E. coli* com *S. cerevisiae* s'han seleccionat per al present treball perquè són components habituals de la flora responsable del deteriorament d'aliments i són comunament emprats com a indicadors de contaminació en aliments.

Es va investigar la combinació de SC-CO<sub>2</sub> amb HHP per a determinar l'efecte de diferents nivells de CO<sub>2</sub> (només HHP (HHP) ; carbonatació i HHP (HHPcarb) ; carbonatació + addició de 8.5 ml de CO<sub>2</sub>/ g puré en l'espai de cap del paquet i HHP (HHPcarb+CO<sub>2</sub>)) sobre l'eficàcia del tractament amb HHP per a inactivar PME, peroxidasa (POD) i polifenol oxidasa (PPO) en puré de feijoa contingut en una bossa de plàstic, a diferents pressions (300, 450 i 600 MPa, durant 5 min).

Els resultats van mostrar que la resistència d'ambdós microorganismes als tractaments d'inactivació amb SC-CO<sub>2</sub> va augmentar progressivament conforme la fase de creixement va avançar, la qual cosa podria deure's a l'activació de sistemes de protecció naturals que desenrotllen els microorganismes conforme s'acosten a la fase estacionària de creixement. Les cinètiques d'inactivació de *E. coli* i *S. cerevisiae* es van ajustar al model de Weibull ( $R^2 = 0.93$ ; RMSE = 0.59) i al model de Gompertz ( $R^2 = 0.96$ ; RMSE = 0.53), respectivament, que van ser adaptats per a considerar la fase de creixement com un dels paràmetres dels citats models.

Emprant SC-CO<sub>2</sub>, la velocitat d'inactivació d'ambdós microorganismes va augmentar progressivament amb la pressió i la temperatura. El temps necessari per a aconseguir una inactivació completa de *E. coli* (8 cicles-log) es va reduir de 60 a 25 min a l'augmentar la pressió de 100 a 350 bar (36 °C), i de 75 a 40 min a l'augmentar la temperatura de 31 a 41 °C (225 bar). La inactivació completa de *S. cerevisiae* (7 cicles-log) es va aconseguir únicament després de 140 min de procés a 350 bar i 36 °C. En general, pressions i temperatures més elevades milloren la solubilització del SC-CO<sub>2</sub> en el medi i incrementen la fluïdesa de la membrana cel·lular, respectivament, facilitant el contacte i la penetració del CO<sub>2</sub>, la qual cosa afavorix el descens del pH intracel·lular i l'extracció de components vitals per a la cèl·lula. No obstant això, a l'aplicar HPU en els tractaments de SC-CO<sub>2</sub> en medis de cultiu, es va observar una dràstica inactivació microbiana, aconseguint-se una reducció total ( $10^7$ - $10^8$  cicles-log) després de només 1-2 min de tractament. Aplicant SC-CO<sub>2</sub>+HPU no es va observar un efecte significatiu en el nivell d'inactivació al augmentar la pressió o la temperatura pel fet que els HPU generen una vigorosa agitació que accelera els mecanismes d'inactivació associats als SC-CO<sub>2</sub> i emmascara l'efecte d'estes variables del procés. A més, la cavitació generada pels HPU podria danyar la paret cel·lular dels microorganismes, accelerant la seua inactivació. L'estudi de l'existència d'un possible efecte sinèrgic entre ambdós tecnologies va revelar que la combinació

de SC-CO<sub>2</sub> i HPU va tindre un major efecte en la inactivació que l'addició dels efectes individuals d'ambdós. Per a *E. coli*, es va aconseguir una reducció de 0.3, 0.9 i 8 cicles-log després de 5 min de tractament amb SC-CO<sub>2</sub>, HPU i SC-CO<sub>2</sub>+HPU, respectivament; per a *S. cerevisiae* es va aconseguir una reducció de 6.83 cicles-log després de 2 min de tractament amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU, mentre que després del mateix període de temps amb només SC-CO<sub>2</sub> o HPU no es va observar cap reducció en el nombre de microorganismes.

En tots els tractaments duts a terme, el rent *S. cerevisiae* va mostrar major resistència als tractaments amb SC-CO<sub>2</sub> que el bacteri *E. coli*, la qual cosa podria estar relacionat amb la major grossària de la paret cel·lular de *S. cerevisiae* comparat amb la de *E. coli*, 124.8 nm front a 17.7 nm, respectivament. No obstant això, al combinar el SC-CO<sub>2</sub> i els HPU, l'agitació vigorosa i la cavitació del medi va emmascarar les diferents resistències mostrades per ambdós microorganismes en els tractaments amb SC-CO<sub>2</sub>.

Les imatges de LM i TEM van mostrar que després de 5 min de tractament amb SC-CO<sub>2</sub> es va produir una distribució irregular del contingut citoplasmàtic i van aparèixer lleugeres modificacions en l'embolcall cel·lular, no sent cap d'estos canvis letals per a les cèl·lules de *E. coli* ni de *S. cerevisiae*. A més, les majors diferències entre ambdós microorganismes es van identificar en l'efecte sobre l'embolcall cel·lular: en *S. cerevisiae* es van observar lleugeres modificacions encara que no es va apreciar ruptura de la paret cel·lular, mentre que la paret de les cèl·lules de *E. coli* van aparèixer amb un alt grau de dissolució, pèrdua de cohesivitat, protuberàncies i algunes àrees desintegrades. No obstant això, 5 min de tractament amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU van ser suficients per a aconseguir una inactivació completa d'ambdós microorganismes. Les imatges de LM i TEM van revelar major proporció de regions buides dins de les cèl·lules tractades amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU, la qual cosa va indicar una clara reducció del contingut citoplasmàtic. L'embolcall de les cèl·lules de *E. coli* es va desintegrar totalment, mentre que les parets de les cèl·lules de *S. cerevisiae* van perdre parcialment la seua estructura laminada i es van poder observar algunes parets trencades. Per

tant, els mecanismes d'inactivació associats als SC-CO<sub>2</sub>+HPU podrien estar relacionats amb el fenomen de cavitació generat pels HPU, el qual danya bruscament l'embolcall cel·lular incrementant tant la ruptura de la membrana cel·lular com la desintegració del contingut intracel·lular. Els danys generats pel tractament de SC-CO<sub>2</sub>+HPU van ser tan severos que van evitar una possible recuperació de les cèl·lules durant un emmagatzemament posterior al tractament (6 setmanes a 4 °C).

Com a mitjana, la inactivació d'ambdós microorganismes amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU en suc de poma (5.3 min) va ser més lenta que en suc de taronja (4.6 min); i en ambdós sucs més lenta que en medis de cultiu (1.5 min). Açò podria estar relacionat amb el contingut de sucre del medi i la solubilització del CO<sub>2</sub> en el mateix. El sucre es lliga a l'aigua del medi, per tant, la quantitat d'aigua disponible on el CO<sub>2</sub> pot dissoldre's és menor en suc de poma (15.6 °Brix) que en suc de taronja (11.6 °Brix); i menor en ambdós sucs que en LB (2 °Brix) o YPD (5 °Brix) Broth. A més, emprant SC-CO<sub>2</sub>+HPU, la velocitat d'inactivació d'ambdós microorganismes inoculats en sucs va augmentar amb la pressió i la temperatura. Açò podria estar relacionat amb la composició dels sucs, els quals no se saturen ràpidament de CO<sub>2</sub> en els tractaments amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU com sí que va ocórrer en les experiències dutes a terme sobre medis de cultiu, de manera que un increment de pressió o temperatura pot facilitar la solubilització del CO<sub>2</sub>.

Contràriament als resultats obtinguts amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU sobre medis de cultiu, on no es van observar diferències entre *E. coli* i *S. cerevisiae*, en sucs *E. coli* va mostrar major resistència que *S. cerevisiae*. Com a mitjana, per aconseguir una completa inactivació de *E. coli* i *S. cerevisiae* es va necessitar un temps de tractament de 6.6 i 3.3 min, respectivament. En sucs, la vigorosa solubilització del CO<sub>2</sub> generada pels HPU podria estar dificultada per un major contingut de sucre, per tant els mecanismes d'inactivació podrien estar governats principalment pel fenomen de cavitació i la grandària dels microorganismes. La grandària de les cèl·lules de *S. cerevisiae* és molt major que el de les de *E. coli*,

per tant, la probabilitat que les bombolles de cavitació afecten l'estructura cel·lular serà major per a *S. cerevisiae* que per a *E. coli*.

D'altra banda, la inactivació de l'enzim PME per mitjà de SC-CO<sub>2</sub>+HPU va augmentar amb la pressió i la temperatura, encara que la seua inactivació completa no es va aconseguir en cap de les condicions estudiades. La inactivació d'enzims tractades per mitjà de SC-CO<sub>2</sub> es deu a la baixada de pH, a l'efecte inhibitori del CO<sub>2</sub> sobre l'activitat enzimàtica i als canvis estructurals generats pel SC-CO<sub>2</sub>. L'enzim PME va mostrar major resistència als tractaments amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU que els microorganismes *E. coli* o *S. cerevisiae* en suc de taronja (es va aconseguir una reducció del 18.9 %, 62.4 % i 88.1 %, a 36 °C i 225 bar després de 2 min de tractament, respectivament), la qual cosa pot atribuir-se a la diferent naturalesa i grandària dels microorganismes i els enzims.

El model de Peleg Tipus A ( $R^2 = 0.936$ ; RMSE = 0.561) i el model de Weibull ( $R^2 = 0.923$ ; RMSE = 0.561) es van adaptar per a descriure les cinètiques d'inactivació de *E. coli* i *S. cerevisiae* amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU en suc de poma, respectivament, incloent la pressió i la temperatura com a paràmetres dels models. El model Bifàsic ( $R^2 = 0.960$ ; RMSE = 0.391), el model de Peleg Tipus B ( $R^2 = 0.894$ ; RMSE = 0.687) i el model fraccional ( $R^2 = 0.931$ ; RMSE = 0.085), es van adaptar per a descriure les cinètiques d'inactivació de *E. coli*, *S. cerevisiae* i PME amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU en suc de taronja, respectivament, incloent com a paràmetres dels models la pressió i la temperatura.

Els resultats van revelar que l'activitat residual dels enzims PME, PPO i POD va descendir conforme va augmentar la pressió, ja que la pressió genera un desordre estructural que pot canviar l'estructura tridimensional dels enzims. Les mostres tractades amb HHPcarb+CO<sub>2</sub> van mostrar un major grau d'inactivació dels tres enzims, comparat amb les mostres tractades amb HHPcarb o HHP, en qualsevol condició de pressió seleccionada. Açò podria deure's a una major quantitat de CO<sub>2</sub> dissolt, que provocaria una major caiguda de pH i la conseqüent desnaturalització dels enzims. A més, el CO<sub>2</sub> dissolt en el puré durant el

tractament de HHP, podria generar un sobtat i significatiu bambolleig durant la despressurització, que podria contribuir a generar majors canvis estructurals responsables de la inactivació enzimàtica.

Finalment, es pot concloure que la combinació de SC-CO<sub>2</sub> amb HPU o HHP va millorar els mecanismes d'inactivació de microorganismes i enzims. L'aplicació de HPU agilitza els tractaments amb SC-CO<sub>2</sub>, accelerant la solubilització del CO<sub>2</sub> en el medi, que és el primer pas en els tractaments amb SC-CO<sub>2</sub>; i generant el fenomen de cavitació que danya les parets cel·lulars, facilitant tant la penetració del SC-CO<sub>2</sub> a les cèl·lules com l'extracció de components intracel·lulars, la qual cosa accelera la mort de les cèl·lules microbianes. A més, la combinació de SC-CO<sub>2</sub> amb HHP va mostrar una millora en la inactivació d'enzims en comparació amb HHP. Emprant estes tecnologies combinades, es poden utilitzar temps de procés raonables per a la indústria alimentària, així com condicions de tractament suaus, la qual cosa resultaria en una reducció del cost del procés i en una minimització de l'impacte sobre les propietats nutricionals i organolèptiques dels productes tractats.

Es recomana dur a terme més investigacions per a conèixer detalladament els mecanismes d'inactivació de microorganismes i enzims amb SC-CO<sub>2</sub>+HPU i SC-CO<sub>2</sub>+HHP. També seria interessant conèixer l'efecte d'estes tecnologies combinades no tèrmiques sobre les propietats fisicoquímiques dels aliments tractades i sobre l'acceptació dels mateixos per part del consumidor.