

Inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia

El cambio en el estilo de vida de los consumidores, y la creciente demanda por parte de los mismos por productos mínimamente procesados, o con periodos de cocción muy cortos, ha generado la necesidad en la industria alimentaria de ofrecer productos saludables e inocuos, elaborados mediante tecnologías innovadoras y respetuosas con el medioambiente. En respuesta a esta necesidad, surgen las tecnologías de conservación no térmicas, que combinan diferentes factores físico-químicos de forma adecuada con el objetivo de reducir el contenido de microorganismos por debajo de un valor crítico, afectando mínimamente a la calidad del producto. En este sentido, la aplicación de CO₂ supercrítico (FSC-CO₂) es una tecnología no térmica de inactivación, respetuosa con el medioambiente, y que ha demostrado ser eficaz para reducir el contenido de microorganismos responsables del deterioro de los alimentos, con un mínimo impacto sobre las propiedades nutricionales y organolépticas de los mismos. El principal inconveniente de la inactivación mediante FSC-CO₂ es la baja velocidad de inactivación microbiana en sistemas discontinuos. Para intentar solventar este problema, varios autores han combinado el FSC-CO₂ con ultrasonidos de potencia (HPU). Esta técnica combinada, ha logrado reducir los tiempos de tratamiento y garantizar la completa inactivación microbiana en matrices alimentarias líquidas, no obstante, existen muy pocas referencias bibliográficas que evalúen la viabilidad de la combinación de estas dos tecnologías (FSC-CO₂+HPU) para aplicaciones sobre matrices sólidas.

En este contexto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la influencia de los HPU en procesos de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂ sobre matrices cárnicas. Para ello, se seleccionaron tres tipos de matrices cárnicas con características diferentes, pechuga de pollo fresco, jamón de pavo (tipo fiambre cocido) y jamón curado. Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la inactivación microbiana, se seleccionó la bacteria *Escherichia coli* DH1, en fase de crecimiento tardía exponencial, como microorganismo modelo, inoculándose sobre la superficie de las muestras cárnicas. Se llevaron a cabo tratamientos de inactivación sobre las muestras cárnicas usando FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, bajo diferentes condiciones de presión (150 - 450 bar), temperatura (36 - 51 °C) y tiempo de

tratamiento (5 – 40 min). Para analizar el efecto de la naturaleza del medio que rodea a las muestras cárnicas, los tratamientos de inactivación descritos previamente, se llevaron también a cabo en muestras de carne sumergidas en una disolución salina (DI), FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI. Posteriormente, se seleccionaron las condiciones (presión, temperatura y tiempo) de tratamiento, que en promedio, permitieron obtener una reducción en la población de *E. coli* de, al menos de 3 ciclos-log, para cada tipo de muestra. Una vez seleccionadas, éstas fueron empleadas para evaluar los cambios en las propiedades físico-químicas y microbiológicas de las muestras tras los diferentes tratamientos y durante su almacenamiento en refrigeración (30 días a 4 °C) para los mejores tratamientos en cada muestra cárnica.

Los resultados mostraron que, empleando FSC-CO₂ a diferentes condiciones de presión (150, 250, 350, y 450 bar), a temperatura constante de 41 °C y 46 °C, la presión no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$) sobre el nivel de inactivación de *E. coli* obtenido en muestras de pechuga de pollo, alcanzando una reducción promedio de 1.5 y 2.5 ciclos-log tras 40 min de tratamiento a 41 y 46 °C, respectivamente. Sin embargo, empleando jamón de pavo, un incremento en la presión de 150 a 350 bar (46 °C), supuso un aumento significativo ($p < 0.05$) del nivel de inactivación de *E. coli*, alcanzando a 350 bar, la reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 20 min de tratamiento. Por otra parte, las cinéticas de inactivación de *E. coli* bajo diferentes condiciones de temperatura sobre muestras de pechuga de pollo (36, 41, 46 y 51 °C; 350 bar) y jamón de pavo (41, 46 y 51 °C; 350 bar) mostraron que el aumento de la temperatura de tratamiento fue un factor determinante para incrementar de forma significativa ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*. Empleando la máxima temperatura de tratamiento (51 °C; 350 bar), la población de *E. coli* se redujo totalmente (6.6 ciclos-log) tras 30 y 10 min de tratamiento en las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, respectivamente. Estos resultados indican que los mecanismos de inactivación están directamente influenciados por la naturaleza de la matriz cárnica, y en algunos casos, se precisa de tiempos de tratamiento muy largos para conseguir la reducción total de la población de *E. coli* inoculada en las muestras cárnicas.

Por ello, para intentar superar las limitaciones encontradas en el proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ en las muestras cárnicas, se llevaron a cabo

las cinéticas de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU, bajo las mismas condiciones de tratamiento usadas sólo con FSC-CO₂. Además, empleando FSC-CO₂+HPU se realizaron tratamientos de inactivación de *E. coli* sobre muestras de jamón curado bajo diferentes condiciones de presión (150, 250, 350 bar), temperatura (41, 46 y 51 °C) y tiempo (5, 10, 15 min) y se usó la metodología de superficies de respuesta, con el objetivo de encontrar las condiciones de tratamiento que permitieran obtener el máximo nivel de inactivación, en el intervalo de condiciones de tratamiento seleccionado. Las condiciones de HPU (42 W ± 5 W; 24 kHz) fueron las mismas para todos los tratamientos evaluados.

La aplicación de HPU durante los tratamientos con FSC-CO₂ (FSC-CO₂+HPU), permitió obtener, en promedio, un nivel de inactivación de *E. coli* significativamente ($p < 0.05$) mayor en muestras de pechuga de pollo (2.1 ciclos-log) y jamón de pavo (3.5 ciclos-log), en comparación a las reducciones encontradas usando sólo FSC-CO₂ (1.6 y 3.1 ciclos-log para pollo y pavo, respectivamente). La presión no mostró un efecto significativo ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* sobre pechuga de pollo y jamón curado, alcanzándose una reducción promedio de 1.3 y 1.6 ciclos-log, respectivamente. Sin embargo, la temperatura aumentó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* en los tres tipos de muestras cárnicas. Empleando la máxima temperatura de tratamiento (51 °C), se redujo totalmente la población de *E. coli* (6.8 ciclos-log) tras 20 y 10 min de tratamiento, en muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, respectivamente. En muestras de jamón curado, la población se redujo 3.5 ciclos-log tras 10 min de tratamiento a 51 °C.

La temperatura del proceso, fue un factor clave para acelerar los mecanismos de inactivación propios del CO₂ en matrices sólidas, favoreciendo la difusión del CO₂ en la matriz y aumentando la fluidez de las membranas celulares, lo que permitió potenciar los mecanismos de inactivación asociados al CO₂. Sin embargo, los elevados tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar una completa inactivación, en comparación a los necesarios empleando matrices líquidas, reflejan que la naturaleza de la matriz cárnica fue determinante en el proceso de inactivación de los microorganismos, generando un efecto protector y limitando el contacto directo del CO₂ con la membrana celular de los mismos.

Los menores niveles de inactivación sobre matrices cárnicas en comparación con líquidos como los zumos, pueden deberse al bajo contenido en agua disponible sobre la superficie de las muestras. La falta de líquido reduciría el efecto mecánico de los ultrasonidos, principalmente por la falta de cavitación en un medio formado únicamente por FSC-CO₂, lo que limitaría la microagitación ultrasónica e imposibilitaría la generación de daños directos sobre las membranas celulares producidos por la cavitación.

En este sentido, se llevaron a cabo tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, bajo las mismas condiciones de presión, temperatura y tiempo estudiados previamente, pero sumergiendo las muestras de carne en 60 ml de una disolución salina estéril (0.9 % de NaCl w/v) (DI).

El sumergir las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo en la DI durante los tratamientos con FSC-CO₂, no mostró un aumento significativo ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* respecto a los valores obtenidos en las muestras sin sumergir. Sin embargo, el sumergir las muestras de carne en DI durante los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU (FSC-CO₂+HPU+DI), en general, permitió reducir significativamente ($p < 0.05$) la población de *E. coli* en las matrices cárnicas, respecto al uso de solo FSC-CO₂+HPU. Por ejemplo, empleando pechuga de pollo sumergida en DI, se alcanzó la inactivación total de *E. coli* tras 10 min mediante FSC-CO₂+HPU+DI a 150 bar y 46 °C, comparado con la reducción de 3.1 ciclos-log lograda en los tratamientos sin sumergir la muestra (FSC-CO₂+HPU), bajo las mismas condiciones de tratamiento.

En general, la presión no presentó un efecto significativo ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación obtenido mediante FSC-CO₂+HPU+DI en las tres muestras cárnicas, sin embargo, como se observó en los tratamientos anteriores, la temperatura incrementó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo y jamón curado. En jamón de pavo se alcanzó una reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 5 min de tratamiento a 51 °C, en comparación a los 3.1 ciclos-log reducidos a 46 °C. En las muestras de jamón curado, el nivel de inactivación obtenido tras 10 min de tratamiento aumentó de 1 a 3.3 ciclos-log, al aumentar la temperatura de 41 °C a 51 °C.

Así pues, el sumergir las muestras cárnicas en una DI mejoró el tratamiento de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂+HPU debido fundamentalmente a los

efectos mecánicos generados por los HPU en la disolución, que pueden ser atribuidos a la cavitación, a movimientos de contracción y rarefacción o a microcorrientes de alta intensidad producidas en el medio. Estos efectos aceleran la solubilización del CO₂ en la DI, su transporte hasta el interior celular y la extracción de componentes vitales. Asimismo, la cavitación puede afectar a la integridad de la membrana celular dando lugar a la inactivación de los microorganismos. En este sentido, se verificó mediante ensayos empleando papel de aluminio, que la cavitación y los efectos intensos de la agitación ultrasónica, solo se producen en los ensayos donde está presente una DI.

Se encontró un efecto sinérgico en la aplicación conjunta de FSC-CO₂ y HPU. Por ejemplo, la reducción de *E. coli* en muestras de jamón de pavo obtenida tras 30 min mediante el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU+DI (150 bar, 46 °C), 6.4 ciclos-log, fue un 45 % superior a la suma de las reducciones obtenidas mediante las técnicas individuales de FSC-CO₂+DI (3.2 ciclos-log) y HPU+DI (1.2 ciclos-log).

Comparando la inactivación alcanzada en las tres muestras cárnicas bajo condiciones de tratamiento similares (250 bar, 46 °C, 10 min), se observó que en las muestras de jamón de pavo se alcanzó un nivel de inactivación promedio (3.7 ciclos-log) significativamente ($p < 0.05$) superior que el obtenido en las muestras de pechuga de pollo (2.0 ciclos-log) y jamón curado (2.5 ciclos-log) empleando FSC-CO₂ + HPU y FSC-CO₂+HPU+DI. Estos resultados reflejan el diferente grado de protección frente a la inactivación microbiana de las tres matrices cárnicas estudiadas; jamón de pavo < jamón curado < pechuga de pollo.

Se usaron diferentes modelos matemáticos para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, obtenidas mediante los distintos tratamientos de inactivación con FSC-CO₂ y HPU. Se empleó la ecuación logística de Peleg para indicar la dependencia de los parámetros de cada modelo, con la presión y temperatura del proceso. El modelo de Weibull generalizado (incluyendo el efecto de presión y temperatura), describió adecuadamente ($R^2_{\text{promedio}} = 0.912$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.317$) las cinéticas de inactivación obtenidas mediante los distintos sistemas de tratamiento considerados (FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU), sobre muestras de pechuga de pollo sumergidas en DI y sin sumergir. En el caso de las muestras de jamón de pavo, el modelo de Peleg Tipo B generalizado ($R^2_{\text{promedio}} = 0.915$; RMSE

promedio = 0.345), describió adecuadamente las cinéticas de inactivación obtenidas mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI, mientras que el modelo Bifásico generalizado mostró un buen ajuste ($R^2_{\text{promedio}} = 0.920$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.565$) de las cinéticas de inactivación obtenidas mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI.

Para evaluar el efecto de los distintos sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂ y HPU sobre la calidad de las muestras cárnicas, se compararon los análisis fisicoquímicos (color, textura, humedad y grasa) de las muestras cárnicas tras su tratamiento, con las muestras control sin tratar. La variación global de color (ΔE) obtenida tras los distintos tratamientos, reveló que los mismos produjeron un cambio significativo de color en todas las muestras, excepto en las muestras de jamón de pavo ($\Delta E < 2.5$, en todos los tratamientos).

Los cambios observados en el color de las muestras de pechuga de pollo tras su tratamiento, pueden ser atribuidos principalmente a la desnaturalización de las proteínas musculares. Este fenómeno cambia las propiedades de la superficie de las muestras, modificando la proporción de la luz que es absorbida y reflejada, creando un color blanquecino en la muestra de pollo. Por otro lado, se observó un aspecto más pálido del jamón curado tras los tratamientos que puede deberse al incremento del contenido de metamioglobina.

Asimismo, los valores de textura (F_{max}) revelaron que la dureza en las muestras de jamón de pavo (0.76 N) no mostraron cambios significativos ($p > 0.05$) para ninguno de los tratamientos aplicados. La dureza de las muestras de pechuga de pollo (4.26 N) y jamón curado (4.97 N), disminuyó significativamente ($p < 0.05$) tras todos los tratamientos estudiados, obteniendo valores de dureza promedio de 3.21 N y 3.53 N para las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, respectivamente. Los resultados de microestructura, realizados en muestras de pechuga de pollo y jamón curado, muestran la rotura de las fibras y desorganización en las miofibrillas así como mayores espacios intermiofibrilares en las muestras tratadas, lo que justificaría los cambios texturales observados.

Por otro lado, la humedad de las muestras no se vio en general afectada por los tratamientos, excepto en el tratamiento mediante FSC-CO₂, tras el cual la humedad disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en las muestras de pechuga de pollo 68.29 % (b. h.) y jamón curado 43.45 % (b. h.), con respecto al control (75.35 y 47.36 % b. h.,

para pechuga de pollo y jamón curado, respectivamente); y en el tratamiento de FSC-CO₂+HPU+DI, donde la humedad de las muestras de jamón de pavo aumentó significativamente ($p<0.05$) respecto de las muestras control pasando de 73.44 a 76.55 % b. h.

Por otra parte, en cuanto al efecto de los diferentes tratamientos sobre el porcentaje de grasa, éste se redujo en las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, no viéndose modificado en el jamón de pavo. Estos resultados reflejan la capacidad del CO₂ para la extracción de compuestos apolares, lo que podría aprovecharse para la obtención de productos cárnicos más saludables, con contenido reducido de grasa.

Finalmente, para analizar la estabilidad de las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI sobre pechuga de pollo y FSC-CO₂+HPU sobre jamón de pavo y jamón curado, se estudió la evolución de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Los resultados revelaron que, en general, las muestras tratadas tuvieron variaciones de color mínimas durante el almacenamiento, mostrando un $\Delta E < 2$ en las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo tras 20 días de almacenamiento. Asimismo, se observaron cambios mínimos en las propiedades texturales de las tres matrices cárnicas estudiadas, manteniendo los valores iniciales de dureza (3.5 N, 0.56 N y 3.1 N, para pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado, respectivamente), durante todo el tiempo de almacenamiento. La humedad de las muestras de carne tras el tratamiento 73.0 %, 73.9 % y 44.9 % (b. h) para pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado, respectivamente, permaneció sin variaciones durante todo el almacenamiento, lo que indica que los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU aplicados a cada tipo de muestra, permitió una estabilidad en la retención de agua de las mismas, limitando las pérdidas por goteo.

La variación en el pH durante el almacenamiento fue distinta para cada tipo de muestra estudiada. En pechuga de pollo, el pH aumentó significativamente ($p<0.05$) tras 30 días de almacenamiento (6.48), en comparación con el pH al inicio del estudio (5.97), lo que podría ser debido a la degradación del tejido muscular; el pH de las muestras de jamón de pavo tras el tratamiento (5.90) aumentó significativamente ($p<0.05$) tras 10 días (6.18), y se mantuvo sin cambios hasta el final del

almacenamiento (30 días). Las muestras de jamón curado no mostraron cambios significativos en el pH (5.90) durante el almacenamiento.

Se analizó el contenido de la microbiota en las muestras cárnicas constituida por mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli* durante los 30 días de almacenamiento a 4 °C. Los resultados mostraron que, en general, al inicio del almacenamiento (justo tras el tratamiento), las muestras cárnicas tratadas no mostraron crecimiento microbiano. Tras 10 días de almacenamiento, las muestras de pechuga de pollo tratadas mostraron un recuento microbiano similar, a la microbiota de la muestra sin tratar, continuando el aumento del recuento microbiano durante todo el tiempo de almacenamiento. En las muestras de jamón de pavo tratadas se retardó el crecimiento microbiano, respecto a la pechuga de pollo, siendo necesarios 20 días de almacenamiento para encontrar un recuento microbiano similar a las muestras sin tratar, en la mayoría de los microorganismos estudiados. En el caso del jamón curado tratado, el crecimiento de los microorganismos fue prácticamente nulo hasta los 20 días de almacenamiento.

Estos resultados mostraron que los tratamientos de inactivación aplicados sobre las muestras cárnicas, provocaron daños reversibles en las células microbianas, logrando éstas, recuperar su actividad biológica durante el almacenamiento refrigerado. El periodo de recuperación varió en función de la resistencia del propio microorganismo al tratamiento y del tipo de matriz cárnica donde se encuentra. En este sentido, el alto contenido en sales y la baja actividad de agua del jamón curado, hace que sobre esta matriz la recuperación fuera más limitada, que en pechuga de pollo, donde la recuperación fue muy rápida.

Así pues, los distintos tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU considerados para cada muestra cárnica consiguen afectar la viabilidad de los microorganismos tras el tratamiento, pero éstos pueden recuperarse. En este sentido, debería estudiarse el uso del envasado al vacío o en atmosfera modificada, para analizar si bajo estas condiciones de almacenamiento es posible retrasar o incluso detener el crecimiento microbiano, tal y como sucede con el jamón curado.

En base a los diferentes resultados obtenidos, puede concluirse que la tecnología combinada de FSC-CO₂+HPU mostro ser eficaz para reducir la viabilidad de la población microbiana en muestras cárnicas, sin deteriorar en exceso sus atributos de

calidad, ni al finalizar el tratamiento, ni durante 20 días de almacenamiento refrigerado. La naturaleza de la matriz fue un factor determinante sobre los efectos causados por el FSC-CO₂+HPU, siendo el jamón de pavo la matriz cárnica donde el tratamiento mostró ser más eficaz para reducir totalmente la población microbiana con cambios mínimos en sus atributos de calidad. De las tres matrices ensayadas, el jamón curado presentó la mayor estabilidad durante su almacenamiento. Por otro lado, la desnaturalización proteica debida al tratamiento con FSC-CO₂+HPU en muestras de pechuga de pollo sumergidas en una disolución salina, podría aplicarse a la elaboración de productos cárnicos preparados pre-cocinados.