

RESUMEN

Los alimentos son susceptibles de ser transformados, ya sea por reacciones bioquímicas o por la acción de microorganismos que modifican sus características originales, provocando su deterioro. Para prolongar la vida útil de los alimentos se utilizan diferentes técnicas de conservación, siendo tradicionalmente los tratamientos térmicos los más empleados. Sin embargo, estas técnicas que emplean altas temperaturas, alteran las propiedades sensoriales y nutricionales del alimento.

Por ello, y junto a la demanda de los consumidores de alimentos frescos y naturales, existe un creciente interés por las técnicas de conservación no térmicas. El objetivo de estas nuevas tecnologías es asegurar la conservación de alimentos, manteniendo su valor nutricional y propiedades organolépticas. El uso de CO₂ en estado supercrítico (SC-CO₂) es una de estas tecnologías. El SC-CO₂ ha sido reseñado por diferentes autores en la inactivación de enzimas y microorganismos, alterando mínimamente las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos.

Los microorganismos cuya inactivación mediante SC-CO₂ ha sido estudiada comprenden desde bacterias gram-negativas como la *Salmonella typhimurium*, *E. coli* o *Yersinia enterocolitica*, a bacterias gram-positivas como *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* o levaduras y hongos. En la mayoría de los estudios se ha observado que las células gram-positivas son más resistentes que las bacterias gram-negativas por el mayor espesor de su pared celular. La levadura *S. cerevisiae* presenta una pared similar a las bacterias gram-positivas, lo que hace que presente una resistencia frente a tratamientos de inactivación, similar a la de las bacterias gram-positivas.

Algunos autores han estudiado también el efecto del SC-CO₂ en un sistema en continuo, observando mayores reducciones comparando con sistemas de SC-CO₂ en discontinuo.

Por otra parte, el uso de fluidos supercríticos asistidos con ultrasonidos de potencia (HPU) permite una vigorosa agitación del medio, una rápida disolución del CO₂ en el medio y por tanto un aumento en la velocidad de los mecanismos de inactivación asociados al CO₂ supercrítico (caída rápida del pH intracelular, incremento en la transferencia de masa, mejora la extracción de los componentes intracelulares vitales

para las células). Dicha tecnología ha sido desarrollada en un sistema en discontinuo, presentando importantes reducciones en el tiempo de inactivación microbiana, comparado con el uso solo de fluidos supercríticos. Sin embargo, en la industria alimentaria se precisa de sistemas en continuo que permitan procesar grandes cantidades de producto. Por otra parte, no se ha reseñado en la literatura el efecto de la combinación de SC-CO₂ y HPU sobre la calidad de los productos procesados.

En este contexto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue desarrollar y aplicar un sistema de inactivación de microorganismos en continuo, empleando fluidos supercríticos asistidos con ultrasonidos de potencia (SC-CO₂-HPU). Se evaluará tanto la capacidad de inactivación microbiana de la técnica como el efecto de los tratamientos sobre la calidad de los alimentos.

La primera etapa del proyecto consistió en la adaptación del sistema de inactivación de microorganismos mediante fluidos supercríticos (SC-CO₂) y ultrasonidos (HPU) disponible en el grupo ASPA (Grupo de Análisis y Procesos Agroalimentarios, Universitat Politècnica de València) para convertir su funcionamiento de discontinuo o lotes a continuo. En esta etapa se rediseñó el equipamiento, teniendo como premisas el aprovechamiento de la mayor cantidad posible de material disponible en la planta existente y manteniendo las condiciones de seguridad, que una instalación a presión de estas características requiere. Para el diseño se tuvo en cuenta la necesidad de prolongar el tiempo de residencia del conjunto CO₂ supercrítico/producto a tratar, al abordarse un proceso en continuo, para ello se introdujo una zona de mantenimiento (holding). La fase de instalación comprendió la redistribución de todos los elementos para adaptarlos a los nuevos requerimientos del equipo. Posteriormente se puso a punto el equipo hasta lograr que el dispositivo desarrollado bombeara simultáneamente y a condiciones supercríticas el CO₂ y un líquido.

La segunda etapa consistió en analizar el efecto de la presión, temperatura y tiempo de residencia sobre la inactivación de *S. cerevisiae* inoculado en zumo de manzana comercial, mediante el sistema desarrollado de SC-CO₂-HPU en continuo. Para ello el zumo fue inoculado con una concentración de células de 10⁷ UFC/mL y fue tratado en el equipo de SC-CO₂ en continuo, con y sin HPU, para evaluar el efecto de los HPU. Las condiciones empleadas fueron: tiempos de residencia de zumo (3.06–9.2 min), temperaturas (31-41°C) y presiones (100-300 bares). Las relaciones de inactivación se

ajustaron a un modelo híbrido (booleano-real) para estudiar el efecto de las variables del proceso. La máxima inactivación lograda por el sistema fue de 7,8 ciclos-log. El modelo híbrido demostró que el uso de ultrasonidos de potencia tiene un efecto significativo sobre la inactivación, sobre todo para tiempos de residencia cortos. Se realizó una optimización multiobjetivo con el modelo híbrido encontrándose que se podían obtener 6.8 ciclos-log de inactivación después de un tiempo de residencia mínimo pequeño (3.1 min) con aplicación de HPU, mientras que en las mismas condiciones pero sin HPU, la inactivación sería de 4.3 ciclos logarítmicos. Por lo tanto, el sistema continuo asistido por ultrasonidos demostró ser una técnica con un gran potencial para la inactivación microbiana usando SC-CO₂ en condiciones moderadas de proceso.

En la tercera etapa se trabajó con zumo de naranja, el cual es uno de los zumos procesados más consumidos a nivel mundial. Sin embargo, para su conservación se requiere un tratamiento mediante calor, el cual provoca grandes cambios organolépticos y nutricionales. En esta parte del trabajo se procesó zumo de naranja en el equipo de SC-CO₂-HPU en continuo, con el fin de comprobar la viabilidad de su uso como método de conservación, evaluando la posible reducción de los inconvenientes atribuidos a la pasteurización térmica. Las condiciones de proceso empleadas fueron: presión (100 bar), temperatura (31, 36 y 41 °C) y tiempo de residencia (3.06 min). El zumo también fue sometido a un tratamiento térmico convencional (pasteurización) a efectos de comparación entre tratamientos. Los análisis realizados a los zumos, después de los tratamientos fueron: microbiota (aerobios mesófilos totales, *E. coli* y *S.cerevisiae*), pH, °Brix, acidez titulable, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, nube, índice de pardeamiento, color y vitamina C. Los resultados experimentales mostraron que el tratamiento mediante SC-CO₂-HPU consiguió la completa inactivación de la población inicial de *E.coli* y aerobios mesófilos totales, sin embargo, la población de *S.cerevisiae* no se inactivó totalmente, aunque se alcanzaron reducciones de más del 99%. Además, tras comparar la tecnología de SC-CO₂-HPU con el tratamiento convencional de pasteurización se observaron cambios inferiores al 1% en el pH y °Brix del zumo, así como cambios menores del 5% en la acidez. Por otra parte, con la tecnología de SC-CO₂-HPU se obtuvo un mayor índice pardeamiento (211%) y mayores cambios en el color de zumo. Sin embargo, se consiguió mejorar la nube del jugo en un 173%, así como también se obtuvo una menor reducción de compuestos fenólicos (6.5%) y ácido ascórbico (5.5%), con respecto al zumo pasteurizado térmicamente. Asimismo, se obtuvo un aumento de la capacidad antioxidante (12%) con respecto al zumo natural. Por tanto, la tecnología

propuesta permite reducir algunos de los efectos negativos en los parámetros de calidad del zumo atribuidos a la tecnología térmica convencional, por lo que su aplicación a nivel industrial puede representar una alternativa a la misma.

La cuarta etapa consistió en evaluar el efecto del tiempo de residencia (3.06-4.6 min) a 100 bares y 31°C sobre las variables de calidad y microbiota de zumo de piña tratado en el equipo de SC-CO₂-HPU en continuo, además de analizar la degradación de Vitamina C y la evolución de la microbiota de zumo de piña fresco y tratado durante el almacenamiento a 4 °C. Los resultados indicaron que la inactivación de la microbiota fue completa y las diferencias obtenidas en los atributos de calidad (2,2% para pH, 4,8% para °Brix, 2% para Vitamina C) fueron muy pequeñas. Durante el almacenamiento, los microorganismos no fueron capaces de recuperarse y la disminución de la vitamina C podría limitarse al 8.2% después de 4 semanas. Así pues, los resultados demostraron que la técnica SC-CO₂-HPU en continuo podría ser una excelente alternativa para la pasteurización en frío de zumo de piña.

Finalmente, se puede concluir que la técnica desarrollada presenta un gran potencial como método de conservación, ya que emplea condiciones de tratamiento moderadas y tiempos de proceso razonables para la industria alimentaria, lo que resultaría en un impacto muy pequeño sobre las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos tratados. Así pues, la técnica ha resultado efectiva en diferentes zumos de frutas con diferentes características (manzana, naranja y piña). Por otra parte, sería conveniente profundizar en el estudio del efecto de la técnica desarrollada sobre las propiedades organolépticas de los zumos, mediante el análisis sensorial de las muestras tratadas.