

## PASTEURIZACIÓN DE EMULSIONES LIPÍDICAS CON CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO Y ULTRASONIDOS DE POTENCIA

### Resumen

Las emulsiones aceite-en-agua son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. En particular, las emulsiones lipídicas se elaboran para nutrición intravenosa y, en consecuencia, su estabilidad microbiana y fisicoquímica desempeña un papel muy importante. En general, para la esterilización de emulsiones lipídicas se usan tratamientos térmicos, normalmente llevados a cabo en autoclaves de vapor a 121°C y 15-20 min. Sin embargo, el calentamiento ha demostrado ser capaz de provocar la hidrólisis de lípidos y lecitina, dando lugar a una bajada del pH y a un aumento del tamaño de gota. En este sentido, están surgiendo tecnologías no térmicas en la industria, con el objetivo de llegar a la estabilidad microbiana evitando la pérdida de calidad relacionada con el calor de los productos tratados térmicamente. El dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) y los campos eléctricos pulsados (PEF) son tecnologías de procesamiento prometedoras para la inactivación microbiana. Sin embargo, se ha demostrado que estas técnicas requieren altas intensidades y/o largos tiempos de tratamiento para garantizar la seguridad del producto, especialmente para la inactivación de formas altamente resistentes de los microorganismos (como son las esporas), o para microorganismos presentes en medios complejos protectores (como los productos con aceite), lo que podría provocar cambios en las propiedades fisicoquímicas de los productos procesados, mayores costes y un mayor impacto medioambiental. Por lo tanto, todavía existe margen de mejora con respecto al uso de estas nuevas tecnologías en términos de intensificación del proceso. La bibliografía ha descrito la capacidad de los ultrasonidos de potencia (HPU) para intensificar los fenómenos de transferencia de masa y/o calor. Por lo tanto, su aplicación a tecnologías no térmicas podría ser un enfoque interesante para mejorar la eficacia de la inactivación microbiana.

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de los tratamientos de SC-CO<sub>2</sub>, PEF y HPU, aplicados de forma individual y combinada, sobre la inactivación de diferentes microorganismos en emulsiones aceite-en-agua. Para lograr este objetivo, por una parte, se estudió la influencia de la implementación de HPU en los tratamientos de SC-CO<sub>2</sub> sobre diferentes tipos de microorganismos y sobre medios con diferente contenido en aceite. Por otra parte, se evaluó el efecto de los tratamientos PEF y HPU individuales y combinados sobre diferentes microorganismos.

Para ello, en primer lugar, se estudió el efecto de la aplicación de HPU sobre la inactivación con SC-CO<sub>2</sub> de dos bacterias vegetativas (*Escherichia coli* y *Brevundimonas diminuta*) y una espora fúngica (*Aspergillus niger*), en un medio simple (agua). Los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> + HPU se realizaron a diferentes presiones (100 y 350 bar) y temperaturas (35, 50 y 60°C). Además, se evaluó la ultraestructura de las células inactivadas mediante SC-CO<sub>2</sub> + HPU con técnicas de microscopía. En segundo lugar, también se investigó la inactivación con SC-CO<sub>2</sub>

y SC-CO<sub>2</sub> + HPU en emulsiones aceite-en-agua para diferentes tipos de microorganismos, incluyendo bacterias vegetativas (*E. coli* y *B. diminuta*), esporas fúngicas (*A. niger*) y esporas bacterianas (*Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Geobacillus stearothermophilus*). Las cinéticas de inactivación se obtuvieron a diferentes presiones (100, 350 y 550 bar) y temperaturas (35, 50, 60, 70, 80, 85 y 95°C). Además, se investigó el efecto del contenido en aceite (0, 10, 20 y 30%) en los medios de tratamiento sobre la inactivación con SC-CO<sub>2</sub> y SC-CO<sub>2</sub> + HPU de bacterias vegetativas (*E. coli* y *B. diminuta*). Finalmente, se exploró el efecto de las condiciones del tratamiento SC-CO<sub>2</sub> + HPU (temperatura, presión y tiempo) sobre las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones (aparición, pH, densidad, tamaño de gota y potencial- $\zeta$ ) utilizando la metodología de superficie de respuesta. De este modo, se buscaron las condiciones del proceso que condujeran a una inactivación microbiana satisfactoria y, al mismo tiempo, a los mínimos cambios fisicoquímicos en las emulsiones.

En cuanto a los tratamientos de PEF y HPU en las emulsiones de aceite-en-agua al 20%, en primer lugar, se realizaron ensayos para la inactivación de *E. coli*. Los tratamientos con PEF se llevaron a cabo a diferentes niveles de energía (de 41.5 a 176.3 kJ/kg) y temperatura de entrada (15 y 25°C). Además, los tratamientos con HPU se realizaron a dos tiempos de procesado (2 y 3 min). Se seleccionaron las condiciones más efectivas para evaluar el efecto de los tratamientos individuales y combinados sobre la inactivación de *E. coli* y de esporas de *A. niger* y *B. pumilus*. También se estudió el efecto de la secuencia de aplicación en los tratamientos combinados (PEF-HPU o HPU-PEF) sobre la inactivación de los tres tipos de microorganismos.

Los resultados experimentales mostraron que la aplicación de HPU intensificó en gran medida la capacidad de inactivación del SC-CO<sub>2</sub>, acortando el tiempo del proceso para casi todos los microorganismos y medios. Por ejemplo, para las bacterias vegetativas, en las emulsiones con un contenido en aceite del 10, 20 y 30%, se acortó el tiempo requerido para la inactivación completa en aproximadamente 1 orden de magnitud al aplicar HPU. Probablemente, los HPU aumentaron la solubilización del CO<sub>2</sub> en el medio y provocaron daños en la pared celular, facilitando la penetración del SC-CO<sub>2</sub> en las células. En este sentido, el análisis de la microscopía de las bacterias vegetativas y las esporas fúngicas inactivadas reveló importantes cambios morfológicos en las células, incluyendo paredes celulares dañadas, y una importante alteración y pérdida del contenido citoplasmático. Por lo tanto, el tratamiento combinado SC-CO<sub>2</sub> + HPU demostró ser eficaz para la inactivación microbiana, a pesar de la complejidad de la pared celular. Sin embargo, los HPU no mejoraron la inactivación con SC-CO<sub>2</sub> de las esporas de *A. niger* en la emulsión. Por ejemplo, a 350 bar y 60°C, la inactivación completa de las esporas de *A. niger* se alcanzó en 10 min, independientemente del uso de HPU.

El aumento de la presión, tanto en los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> como con SC-CO<sub>2</sub> + HPU, dio lugar a mayores niveles de inactivación, a excepción de *E. coli* en agua, donde no se encontró efecto de la presión. Sin embargo, las presiones por encima de 350 bar no parecieron conllevar a una inactivación adicional, probablemente porque un aumento en la presión apenas mejoró la solubilidad del SC-CO<sub>2</sub>. El aumento de la temperatura tuvo un efecto significativo

( $p < 0.05$ ) para todos los tratamientos (térmicos, SC-CO<sub>2</sub> y SC-CO<sub>2</sub> + HPU) y microorganismos. Por ejemplo, en 20 min de tratamientos térmicos, SC-CO<sub>2</sub> y SC-CO<sub>2</sub> + HPU, la inactivación de las esporas de *B. subtilis* aumentó de 0.1 a 2.7 ciclos-log, de 3.1 a 6.2 ciclos-log y de 5.4 a 6.7 ciclos-log, respectivamente, de usar 85 a 95°C.

La resistencia de los microorganismos a los tratamientos de inactivación con SC-CO<sub>2</sub> y SC-CO<sub>2</sub> + HPU fue, en orden de menos a más resistente: bacterias vegetativas (*E. coli* y *B. diminuta*), esporas fúngicas (*A. niger*), esporas de *Clostridium* (*C. butyricum*), esporas de *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. pumilus*) y por último, esporas de *Geobacillus* (*G. stearothermophilus*), siendo la inactivación de estas últimas inviable utilizando las tecnologías propuestas en el presente trabajo.

En cuanto al efecto del medio sobre la inactivación microbiana, se sabe que la presencia de aceite protege a los microorganismos y, generalmente, se necesitan tratamientos más intensos, como se observó en la inactivación con SC-CO<sub>2</sub> de *E. coli* y *B. diminuta* en agua y en las emulsiones con diferente contenido en aceite (10, 20 y 30 %). Sin embargo, la aplicación de HPU enmascaró el efecto protector ejercido por el aceite de las emulsiones y minimizó las diferencias en la inactivación microbiana. Por ejemplo, en 50 min del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> a 350 bar y 35°C, se inactivaron 7.4 ciclos-log de *E. coli* en agua (0% de contenido en aceite), mientras que se inactivaron 3.4, 4.3 y 5.2 ciclos-log en las emulsiones con un 30, 20 y 10% de contenido en aceite, respectivamente. Sin embargo, en 5 min de tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> + HPU a 350 bar y 35°C, se obtuvo una inactivación de 6.2-7.0 ciclos-log para *E. coli*, independientemente del contenido en aceite en el medio. Por el contrario, para las esporas de *A. niger* no se encontró efecto del medio (agua o emulsión al 20%) sobre la efectividad de ambos tratamientos de inactivación, SC-CO<sub>2</sub> y SC-CO<sub>2</sub> + HPU, y, en promedio, se obtuvo una inactivación de 4.4 y 4.3 ciclos-log en agua o en la emulsión, respectivamente.

En relación al efecto de los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> + HPU sobre la calidad de las emulsiones tratadas, en términos generales, solo se encontró un efecto leve de las condiciones del proceso (temperatura, presión y tiempo) sobre las propiedades fisicoquímicas. Las emulsiones tratadas presentaron, en general, buen aspecto, cambios mínimos en la densidad, buena estabilidad electrostática, un pH más bajo (de 8.4 a 5.1-5.6) y un mayor tamaño medio de gota (D[4,3] de 0.365 a 0.338-7.996  $\mu\text{m}$ ; D[3,2]: de 0.343 a 0.320-1.505  $\mu\text{m}$ ). Por lo tanto, mediante la selección de condiciones de SC-CO<sub>2</sub> + HPU adecuadas (por ejemplo, 95°C, 600 bar y 12.5 min), se pueden obtener cambios mínimos en las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones y una inactivación satisfactoria para todos los microorganismos estudiados, excepto para las esporas de *G. stearothermophilus*.

Por lo tanto, la tecnología SC-CO<sub>2</sub> + HPU podría ser una alternativa prometedora a la pasteurización térmica de emulsiones que permitiría preservar mejor los compuestos sensibles al calor, ya que se pueden utilizar temperaturas más bajas. Sin embargo, las variables de proceso del tratamiento deben evaluarse y seleccionarse para mantener la calidad de las emulsiones al tiempo que se inactivan los microorganismos diana.

En cuanto a la inactivación microbiana de emulsiones con tratamientos de PEF y HPU, los resultados revelaron que la inactivación máxima alcanzada por el tratamiento individual de PEF, al mayor nivel de energía y temperatura de entrada (152.3-176.3 kJ/kg y 25°C) fue de 2.6, 1.2 y 0.1 ciclos-log para *E. coli*, *A. niger* y *B. pumilus*, respectivamente. Además, los mayores niveles de inactivación alcanzados por HPU para el tratamiento más largo estudiado (3 min), fueron 5.4, 4.3 y 0.3 ciclos-log para *E. coli*, *A. niger* y *B. pumilus*, respectivamente. Por lo tanto, la inactivación microbiana completa en las emulsiones no se logró con los tratamientos individuales. Sin embargo, cuando el tratamiento de PEF (152.3-176.3 kJ/kg) fue seguido por el tratamiento de HPU (3 min), los niveles de inactivación obtenidos fueron de 8.2, 6.6 y 1.0 ciclos-log para *E. coli*, *A. niger* y *B. pumilus*, respectivamente, correspondiendo a la inactivación completa de *E. coli* y *A. niger*. Además, el tratamiento combinado PEF-HPU presentó un efecto sinérgico, ya que la inactivación alcanzada fue mayor que la suma de los tratamientos individuales para todos los microorganismos. A pesar de este hecho, la inactivación lograda para la espora bacteriana (*B. pumilus*) fue muy limitada. Por el contrario, los niveles de inactivación alcanzados por el tratamiento inverso (HPU seguido de PEF) fueron inferiores a la suma de los tratamientos individuales. Por lo tanto, la secuencia más eficaz para el tratamiento combinado fue aquella en la cual los PEF fueron seguidos de los HPU. En este sentido, el tratamiento PEF probablemente ejerció efectos subletales sobre los microorganismos, haciendo que las células microbianas estuvieran más sensibles al tratamiento posterior de HPU. Por lo tanto, el tratamiento combinado PEF-HPU demostró ser una tecnología prometedora para inactivar bacterias vegetativas o esporas fúngicas en emulsiones. No obstante, su uso no fue efectivo para las esporas bacterianas en las condiciones probadas en el presente trabajo.

La resistencia de los microorganismos a los tratamientos de PEF y HPU, aplicados individualmente o en combinación, siguió el mismo orden que el encontrado para los tratamientos de SC-CO<sub>2</sub>, siendo las bacterias vegetativas las más sensibles, seguidas de las esporas fúngicas y por último, de las esporas bacterianas.

Finalmente, se puede concluir que, la combinación de HPU con SC-CO<sub>2</sub> o PEF generalmente mejoró la inactivación microbiana. Además, en algunos casos, se demostró que la combinación de los tratamientos logró efectos sinérgicos. En consecuencia, mediante el uso de las técnicas combinadas estudiadas, se podrían seleccionar tiempos de procesamiento industriales razonables y condiciones de proceso suaves, que podría resultar en una reducción en el coste de procesamiento y un menor impacto en la calidad de las emulsiones aceite-en-agua. Sin embargo, para comprender mejor los mecanismos de inactivación ejercidos por los tratamientos combinados de SC-CO<sub>2</sub> y HPU y los tratamientos combinados de PEF y HPU, es necesario realizar un trabajo en mayor profundidad, especialmente en el caso de esporas fúngicas y bacterianas. Además, se recomienda investigar más acerca del efecto de estas tecnologías no térmicas combinadas sobre las propiedades fisicoquímicas de los productos tratados, en particular para los tratamientos combinados de PEF y HPU, aspecto que no ha sido abordado en el presente estudio