

Universidad Politécnica de Valencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INACTIVACIÓN POR ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS DE *Rhodotorula glutinis* Y *Penicillium aurantiogriseum* EN MEDIO REFERENCIA AGUA PEPTONA

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Autor: Edwin Fabián Torres Bello

Director: Antonio Martínez López

Codirigido: María Consuelo Pina

Centro: IATA-CSIC

Valencia, Enero 2013

INACTIVACIÓN POR ALTAS PRESIONES HIDROSTATICAS DE *Rhodotorula glutinis* Y *Penicillium aurantiogriseum* EN MEDIO REFERENCIA AGUA PEPTONA

Torres, E.F., Pina-Pérez, M.C. & Martínez, A.¹

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) Avenida Agustín Escardino, 7 Parque Científico 46980 Paterna, Valencia, España

RESUMEN

La tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) es la tecnología no térmica de conservación de alimentos más desarrollada comercialmente, caracterizada por conseguir niveles de inactivación de microorganismos y enzimas, semejantes a los conseguidos mediante pasterización térmica, preservando en mayor medida las propiedades sensoriales y nutritivas del producto. Para conseguir esta inactivación se utilizan niveles de presión que varían entre 100-800 MPa (Mega Pascal) con tiempos relativamente cortos (en orden de segundos a varios minutos), en combinación de temperatura moderada (20-50°C). En el presente estudio, la levadura *Rhodotorula glutinis* y el moho *Penicillium aurantiogriseum*, alteradores de la vida útil de productos alimenticios, fueron tratados utilizando presiones de 200, 300, 350 y 400 MPa por un tiempo entre 1 a 15 minutos. Los resultados obtenidos muestran que tanto *R. glutinis* como *P. aurantiogriseum* son sensibles a los tratamientos por APH. Los resultados indican que presiones de 350 MPa - 5 minutos permiten alcanzar un nivel máximo de inactivación de $5.91 \pm 0,28$ ciclos logarítmicos para *R. glutinis*, y de $5.20 \pm 0,08$ ciclos logarítmicos, para *P. aurantiogriseum*, con una presión de 400 MPa - 3 minutos en el medio de referencia, agua de peptona al 0.1%, con variación en las concentraciones de cloruro de sodio de (0,1-0,5-0,8%) y pH de 6.5. Las curvas de inactivación se ajustaron al modelo de distribución de Weibull. Este modelo permite ajustar curvas de inactivación no logarítmicas, es decir con hombros o con colas

PALABRAS CLAVE: Altas presiones, *R. glutinis*, *P. aurantiogriseum*, cloruro sódico, cinéticas de inactivación.

RESUM

La tecnologia d'Altes Pressions Hidrostàtiques (APH) és la tecnologia no tèrmica de conservació d'aliments més desenvolupada comercialment, caracteritzada per aconseguir nivells d'inactivació de microorganismes i enzims, semblants als que assolim mitjançant pasteurització tèrmica, preservant en major mesura les propietats sensorials i nutritives del producte. Per aconseguir esta inactivació s'utilitzen nivells de pressió que varien entre 100-800 MPa (Mega Pascal) amb temps relativament curts (en

ordre de segons a diversos minuts), en combinació amb temperatura moderada (20-50 ° C). En este estudi, el llevat *Rhodotorula glutinis* i la floridura *Penicillium aurantiogriseum*, alteradors de la vida útil de productes alimentaris, van ser tractats utilitzant pressions de 200, 300, 350 i 400 MPa per un temps entre 1 a 15 minuts. Els resultats obtinguts mostren que tant *R. glutinis* i *P. aurantiogriseum* són sensibles als tractaments per APH. Els resultats indiquen que pressions de 350 MPa - 5 minuts permeten assolir un nivell màxim d'inactivació de $5.91 \pm 0,28$ cicles logarítmics per *R. glutinis*, aconseguint una inactivació màxima de $5.20 \pm 0,08$ cicles logarítmics, per *P. aurantiogriseum*, amb una pressió de 400 MPa - 3 minuts en el medi de referència, aigua de peptona al 0.1%, amb variació en les concentracions de clorur de sodi (0,1-0,5-0,8%) i pH de 6.5. Les corbes d'inactivació es van ajustar a un model no linial: el model de distribució de Weibull.

PARAULES CLAU: altes pressions, *R. glutinis*, *P. aurantiogriseum*, clorur de sodi, cinètiques d'inactivació.

ABSTRACT

The technology of High Hydrostatic Pressure (HHP) is the non-thermal food technology more commercially developed, that has been characterized by means the achievement of microbial and enzymatic inactivation levels close to thermal pasteurization ones, preserving sensory and nutritional properties of the processed products. To achieve this level of inactivation it is used a pressure level in the range [100-800] MPa (Mega Pascal) with short treatment times (in order of seconds to several minutes), combined with moderate temperature (20-50°C). In the present study, the yeast *Rhodotorula glutinis* and the mold *Penicillium aurantiogriseum*, spoilage microorganisms responsible of the alteration of the product quality and the reduction of its shelf life, were treated by HHP at pressure levels of 200, 300, 350 and 400 MPa and treatment times from 1 to 15 minutes. The obtained results shown that both, *R. glutinis* and *P. aurantiogriseum*, are sensitive to HHP applied treatments. HHP treatment of 350 MPa - 5 min leads to a maximum inactivation level of $5.91 \pm 0.28 \log_{10}$ cycles for *R. glutinis*, achieving a maximum of $5.20 \pm 0.08 \log_{10}$ cycles for *P. aurantiogriseum*, with HHP treatment of 400 MPa - 3 min in reference media, buffered peptone water 0,1%, at concentration of sodium chloride in the range 0,1-0,8% and pH 6,5 . Inactivation kinetics were fitted to the Weibull distribution function. This model fits non logarithmic curves, i.e shoulder or tailed curves.

KEYWORDS: High pressure, *R. glutinis*, *P. aurantiogriseum*, sodium chloride, inactivation kinetics.

INTRODUCCIÓN

Actualmente los consumidores requieren una mayor calidad y seguridad en los alimentos que adquieren. Para satisfacer estas demandas la industria agroalimentaria ha mejorado sus procesos de conservación por calor, tales como los tratamientos continuos HTST, UHT y el envasado aséptico. A pesar de estas mejoras los productos alimenticios siguen presentando pérdidas en su calidad final. Debido a la elevada demanda por parte de los consumidores en los últimos años de productos mínimamente procesados, que conserven en gran medida las características de seguridad, nutricionales y de sabor, todo esto con una larga vida útil de almacenamiento (Chevalier et al., 2001), se hace necesario aplicar nuevas tecnologías que logren obtener productos de alta calidad que cumplan con las necesidades del mercado actual.

Durante los últimos años se han desarrollado diferentes tecnologías de conservación que han tratado de dar respuesta a las demandas del consumidor: alimentos microbiológicamente seguros, larga vida útil y de mayor calidad. Dentro de este grupo podemos encontrar las denominadas 'tecnologías no térmicas de conservación', que son aquellas que no utilizan la temperatura como principal forma de inactivación de microorganismos y enzimas. Si bien es cierto que en la mayoría de estos tratamientos se produce un leve incremento de la temperatura, este nunca llega a ser tan elevado como en un tratamiento térmico. Entre estas nuevas tecnologías se encuentran los campos magnéticos oscilatorios, pulsos eléctricos de alta intensidad, ultrasonidos de alta intensidad, la irradiación y las altas presiones hidrostáticas (APH). En respuesta a esa continua necesidad de mejora en calidad y seguridad de alimentos, por parte de investigadores y productores, la tecnología de APH ha demostrado, en el procesado de alimentos sólidos y líquidos, envasados o no, que es capaz de preservar en gran medida las propiedades sensoriales y nutritivas a temperatura ambiente, presentando niveles adecuados de inactivación de microorganismos y enzimas.

El objetivo principal de estas nuevas tecnologías no térmicas es lograr alimentos que conserven al máximo todas las características de frescura y sabor sin renunciar a la seguridad alimentaria. Es por esto que las Altas Presiones Hidrostáticas están adquiriendo una gran relevancia en los últimos años como alternativa al tratamiento térmico en el procesado, por ejemplo, de productos cárnicos loncheados, ostras crudas, jaleas de fruta y mermeladas, zumos de fruta, aliños para la ensalada, calamar crudo, pasteles de arroz, hígado de pato, jamón y guacamole, platos preparados, entre otros, ya que se han obtenido resultados importantes en inactivación de microorganismos y enzimas sin alterar su calidad final (Polydera et al., 2003). Todo ello hace de las APH, la tecnología no térmica de conservación de alimentos más desarrollada comercialmente, con muy buena aceptación por parte de los consumidores, que valoran las características

organolépticas de los productos tratados por presión, ya que los asocian a productos naturales y con muy poca transformación.

Para conseguir esta inactivación se utilizan presiones que varían entre 100-800 MPa (Mega Pascal) con tiempos relativamente cortos (en orden de pocos segundos a varios minutos) y en combinación con temperatura moderada (20-50°C). Las condiciones de procesado dependen principalmente del alimento a tratar, por lo que esta tecnología es todavía ineficaz con algunas clases de microorganismos esporulados, ya que estos presentan una extrema resistencia a las altas presiones (Ratphitagsanti et al., 2009; Barbosa et al., 1999).

En cuanto al tipo de microorganismos tratados con APH, mohos y levaduras son los más sensibles, seguidos por las Gram negativas con una sensibilidad media y por último las Gram positivas, con una mayor resistencia (Smelt, 1998). Aunque actualmente no se conoce realmente cómo se lleva la inactivación de los microorganismos, se ha determinado como causa principal, las alteraciones morfológicas, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula. En especial se producen cambios a nivel de pared celular, dependiendo directamente de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el microorganismo, ya que las células en fase logarítmica presentan una mayor sensibilidad a las APH, más que aquellas en fase estacionaria. Esto debido a que en la en la primera fase se encuentran en división celular y por tanto la membrana es más sensible a los factores externos (Barbosa et al., 1999; Amiali, 2007)

Aunque existen bastantes estudios en relación al efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas sobre bacterias, la información referente a mohos y levaduras es relativamente escasa. Estos microorganismos frecuentemente alteran cereales, vegetales mínimamente procesados, derivados lácteos como: mantequilla, yogur, queso fresco, entre otros (Evert-Arriagada et al., 2012; Rosaria-Corbo et al., 2001) El queso fresco al ser un alimento de consumo masivo y que cuenta con propiedades fisicoquímicas especiales como un pH cercano a la neutralidad, una actividad de agua elevada 0,97, humedad relativa alta, con lo anterior resulta de gran interés para ser estudiado aplicando las Altas presiones Hidrostáticas.

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de las Altas Presiones Hidrostáticas (APH), en la inactivación de mohos y levaduras alteradores que disminuyen la vida útil de productos alimenticios (*Penicillium aurantiogriseum*, *Rhodotorula glutinis*), en condiciones de tratamiento equivalentes a las de pasteurización térmica (niveles de inactivación microbiana ≥ 5 ciclos \log_{10}).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos microbianos

Las cepas de microorganismos *P. aurantiogriseum* y *R. glutinis*, utilizados para realizar este estudio, se obtuvieron a partir de aislamientos ambientales industriales aportadas por el Departamento de ciencias de los alimentos, Grupo de fisiología y biotecnología de postcosecha del Instituto de Agroquímica y tecnología de alimentos (IATA). Estas cepas se utilizaron ya que presentaban características propias al proceso productivo industrial.

La levadura *R. glutinis* se cultivó en superficie en medio sólido Potato Dextrose Agar (PDA, Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España) por 3 días a 25°C, las colonias se recuperaron en agua peptonada al 0.1% una vez recuperadas, el inóculo se estandarizó utilizando recuento en placa y conteo en cámara de Neubauer (Brand®, Wertheim, Alemania). Con una concentración final de 1×10^6 ufc/ml

En cuanto a las esporas de *P. aurantiogriseum*, se obtuvieron después de incubar 5 días a 25°C en medio sólido Potato Dextrose Agar (PDA, Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España). Las esporas se recuperaron en agua desionizada estéril, y la suspensión fue filtrada posteriormente utilizando papel de filtro con tamaño de poro de 25µm, con el fin de remover los restos de micelios. Una vez recuperadas, el inóculo se estandarizó utilizando recuento en placa y conteo en cámara de Neubauer (Brand®, Wertheim, Alemania). Con una concentración final de 1×10^6 ufc/ml

Medio de referencia

Como sustrato de estudio se utilizó agua de peptona tamponada al 0.1% (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España). Los estudios se realizaron para concentraciones de Cloruro de sodio de 0% (control), 0,1, 0,5, y 0,8%, a un pH de 6,5.

Una vez estandarizado cada uno de los inóculos con concentración conocida 1×10^6 , se distribuyó 30 ml del medio de referencia en bolsas de polietileno metalizadas y se termo-sellaron inmediatamente, el medio presentaba diferentes concentraciones de Cloruro de sodio y cada uno de los microorganismos se trató por separado (*R. glutinis*, *P. aurantiogriseum*), cada tratamiento se realizó por triplicado.

Tratamiento APH

Para cada tiempo y presión se utilizaron tres muestras independientes situadas en las bolsas de polietileno metalizadas y termo-selladas (MULTIVAC, Thermosealer) después de esto se depositaron en el equipo de APH. El tratamiento se realizó utilizando una mezcla de agua con etilenglicol como agente presurizante, la temperatura se controló utilizando una camisa de refrigeración, conectada a un criostato para controlar la temperatura constante durante el experimento con una temperatura máxima de tratamiento de 32 °C (inicial de 20°C).

La presión, temperatura y el tiempo de tratamiento se controlaron automáticamente, el tiempo de despresurización fue menor a 1 minuto en todas las experiencias. Las presiones utilizadas para tratar el medio de referencia fueron de 200, 300, 350 y 400 MPa por un tiempo entre 1 a 15 minutos

Análisis microbiológico

Tras el tratamiento, se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 0.1% estéril (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España), que se sembraron en profundidad por triplicado en agar potato dextrosa con adición de Cloranfenicol (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España). Para levaduras y mohos se realizó una incubación de 3-5 días, respectivamente, a 25°C.

Cinéticas de inactivación por APH

El modelo de distribución de Weibull ha sido extensamente aplicado para describir el comportamiento microbiano al tratamiento por tecnologías térmicas (Fernández et al., 2002; Collado et al., 2003) y no térmicas de conservación (Coroller et al., 2012), tanto en media de referencia (Pina-Pérez et al., 2007) como en matrices reales (Elez-Martinez et al., 2007; Igual et al., 2013). Este modelo consiste en una distribución de frecuencias que considera al microorganismo como una población, donde cada individuo tiene una resistencia al tratamiento, por lo tanto las curvas de inactivación representan la distribución de la resistencia del conjunto de la población al tratamiento. Bajo esta perspectiva es más fácil explicar que no exista una relación lineal entre el tiempo de tratamiento y la muerte del microorganismo. Aparte de su sencillez, se trata de un modelo de gran flexibilidad, adecuado en la interpretación de curvas con hombros y colas, y líneas rectas. Esta distribución ha servido para describir curvas de inactivación por calor y por PEAI (Rodrigo et al., 2003, Sampedro *et al.*, 2006) (ver Ecuación 1)

$$S(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{b}\right)^n\right) \quad (1)$$

donde S es la fracción de supervivientes, t es el tiempo de tratamiento expresado en minutos, b es el parámetro de escala expresado en MPa relacionado con la intensidad del tratamiento y n es el parámetro de forma, cuyo valor depende de la forma de la curva de supervivencia. Cuando el valor de n<1 las curvas de supervivencia presentan colas, es decir, la fracción residual de células que quedan por inactivar a tiempos largos, tienen menos probabilidades de morir, son las más resistentes, o las que mejor se han adaptado al estrés producido por los tratamientos. Cuando el valor de n>1, las curvas de supervivencia presentan hombros indicando que para tiempos cortos de tratamiento las

células son resistentes, hasta un punto en el que tiempos más largos de tratamiento, se traducen en niveles mayores de inactivación. En el caso que el valor de $n=1$ la probabilidad que el microorganismo muera no depende del tiempo de tratamiento, en otras palabras, cada célula es igual de sensible al tratamiento sin importar lo que dure el mismo.

Análisis estadístico

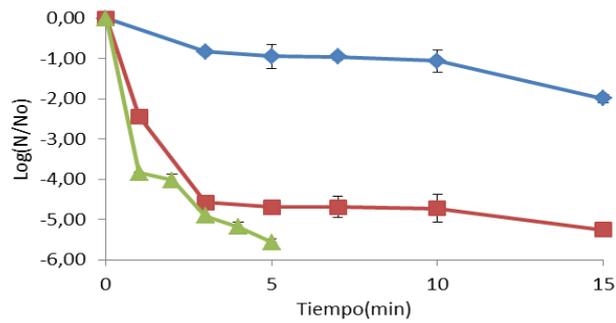
Para evaluar el efecto de la presión, tiempo y la concentración de cloruro de sodio en la inactivación microbiana de *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum*, se realizó análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias, con un nivel de confianza del 95%, utilizó la distribución de Fisher (L.S.D) para contrastar la igualdad de varianzas. Los datos experimentales se ajustaron a modelos matemáticos de regresión no lineal, como se mostró anteriormente. Todos los datos estadísticos fueron analizados con Statgraphics centurion XV, StatPoint, Inc.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

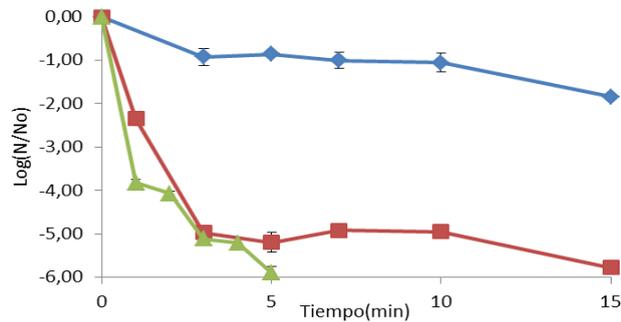
Efecto APH sobre *Rhodotorula glutinis* en medio referencia agua de peptona tamponada

En la figura 1 se presentan las curvas de supervivencia para *Rhodotorula glutinis* tratada por APH en medio de referencia. Ambos parámetros de proceso, Presión (P, MPa) y el tiempo de tratamiento (t, min) afectan significativamente ($p < 0.05$) los niveles de inactivación alcanzados. A medida que se incrementa la presión de tratamiento, aumenta la inactivación obteniendo una inactivación máxima de 5.91 ± 0.28 ciclos logarítmicos a una presión de 350 MPa - 5 min, temperatura inicial de tratamiento 20°C (temperatura final 32°C), pH 6.5, independientemente de la concentración de cloruro sódico añadida al medio. Además, para cada nivel de presión, observamos la influencia del tiempo de tratamiento, con caídas rápidas a tiempos cortos (1 ciclo \log_{10} (200 MPa - 5 min); 4.50 ciclos \log_{10} (300 MPa - 3 min); 4 ciclos \log_{10} (350 MPa - 1 min)), que dan lugar a la aparición de colas a tiempos largos. Este fenómeno en cinéticas de inactivación microbiana ha sido ampliamente observado por diversos autores en el tratamiento con tecnologías térmicas y no térmicas de conservación (Pina-Pérez et al., 2007; Chen y Hoover, 2004; Torres et al., 2008)

(A)



(B)



(C)

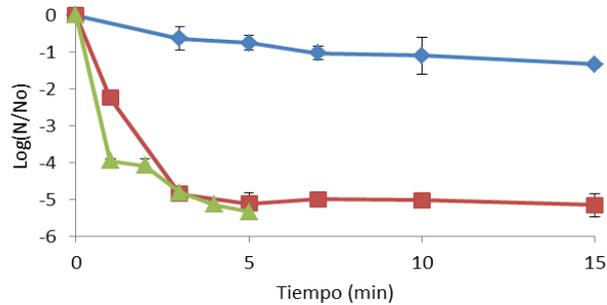
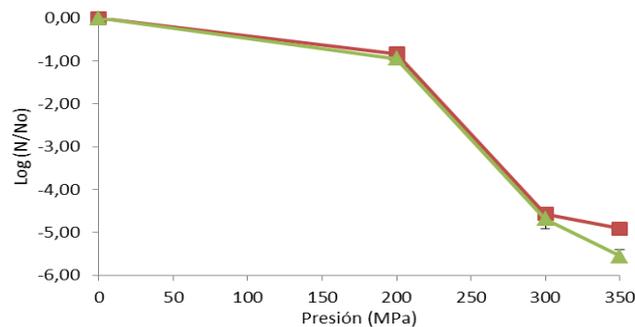


FIGURA 1. Inactivación de *R. glutinis* en agua de peptona a diferentes tiempos, concentraciones de NaCl (A) 0,1%, (B) 0,5%, (C) 0,8% y presiones (◆) 200, (■) 300, (▲) 350 MPa, pH: 6.5 y temperatura de tratamiento de 20°C,

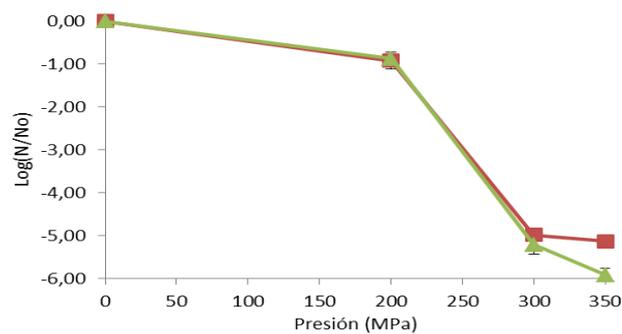
En cuanto al efecto de la concentración de cloruro de sodio en el medio de referencia, no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles de inactivación alcanzados para cada una de las concentraciones estudiadas, a las diferentes presiones y tiempos de tratamiento. Por tanto no se presenta una interacción directa entre el aumento de la presión y la concentración de cloruro de sodio, como se puede observar en la figura 2, para los tiempos de 3 y 5 minutos comunes a todos los tratamientos. Estos resultados coinciden con estudios previos con bacterias donde se concluye

que no existe una interacción entre las bajas concentraciones de cloruro de sodio y el tratamiento de por altas presiones. Entre ellos, destaca el publicado por Duranton et al., (2012) donde se observa que para concentraciones de 1,5 a 3 % de cloruro sódico en combinación con tratamiento de APH de 350 MPa - 6 min(20 °C) no generan una reducción significativa de la carga inicial de microorganismos.

(A)



(B)



(C)

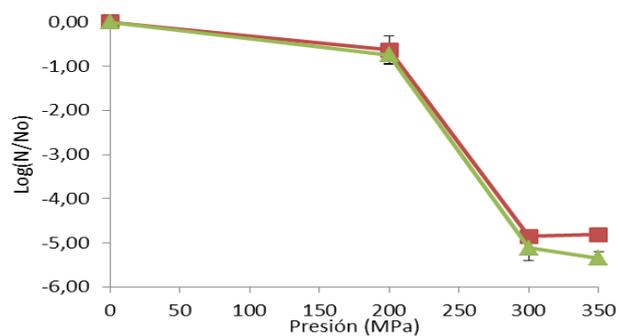


FIGURA 2. Efecto del cloruro de sodio en el tratamiento de altas presiones, en la inactivación de *R. glutinis* en medio de referencia agua de peptona a tiempos (■) 3, (▲) 5 minutos y concentraciones de NaCl (A) 0,1%, (B) 0,5%, (C) 0,8%, pH: 6,5, temperatura de tratamiento de 20°C.

Modelización Matemática

Las curvas de supervivencia a las APH para la levadura *Rhodotorula glutinis*, tratada bajo las diferentes condiciones en estudio presentan colas como se ha comentado previamente. El modelo de Weibull fue seleccionado de acuerdo a bibliografía (Donsi et al., 2012; Pina-Pérez et al., 2012), como modelo adecuado en la descripción del comportamiento microbiano bajo el efecto de las APH en cinéticas que presentan tanto hombros como colas (presente estudio). En la tabla 1 se incluyen los valores de los parámetros cinéticos del modelo (b y n), así como los indicadores de la bondad del ajuste (R^2 -ajustado y MSE). Como se puede observar en la tabla 1, el parámetro b del modelo de Weibull, presenta un aumento a medida que se incrementa la intensidad de tratamiento, indicador de la resistencia de la *R. glutinis* frente al tratamiento por APH. Niveles mayores de b , indican una mayor rapidez en la inactivación celular, y por tanto una mayor sensibilidad de las células bajo condiciones más intensas de tratamiento. El parámetro de forma, n , resultó en todo caso <1 , indicando la concavidad de las curvas de supervivencia obtenidas. Para un mismo nivel de presión, incrementos considerables en el tiempo de tratamiento, no se traducen en incrementos significativos en el nivel de inactivación, evidenciando la existencia de subpoblaciones supervivientes y más resistentes a los tratamientos, de acuerdo a estudios previos llevados a cabo por Peleg (2000) y Buzrul et al. (2005).

TABLA 1. Valores del parámetro b y n del modelo de Weibull, valores de R^2 -ajustado y MSE en las curvas de supervivencia de *R. glutinis* a diferentes presiones

Presión Mpa	Concentración % NaCl	Weibull		R-Squared	MSE
		b	n		
200	0,1	0,2975	0,6617	90,1005	0,0498
	0,5	0,3820	0,5390	90,1526	0,0422
	0,8	0,3821	0,4642	98,9810	0,0027
300	0,1	3,0958	0,2081	99,5295	0,0227
	0,5	3,2082	0,2257	98,5747	0,0810
	0,8	3,2231	0,2080	99,8787	0,0064
350	0,1	3,6493	0,2539	99,2317	0,0396
	0,5	3,6141	0,2881	98,9093	0,0610
	0,8	3,7954	0,2104	99,3990	0,0296

La figura 3 muestra el ajuste al modelo de Weibull de los datos experimentales obtenidos a 350MPa y concentración 0,5% de NaCl.

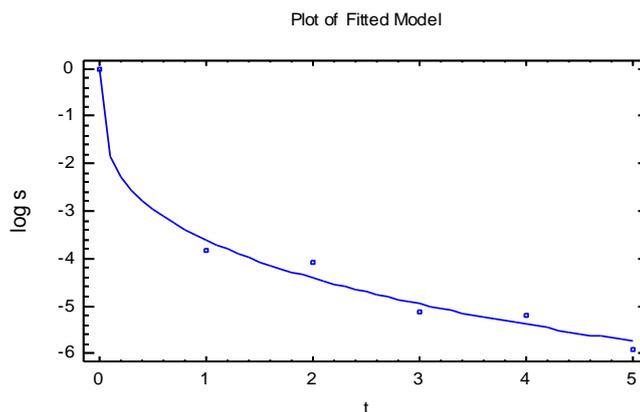


FIGURA 3. Ajuste de datos experimentales al modelo de Weibull para presión de 350MPa y concentración de NaCl 0.5%

Los valores del parámetro b de Weibull para *R. glutinis* a diferentes presiones y concentraciones de NaCl presentan una tendencia lineal, evidenciando que un incremento en la presión de tratamiento, aumenta la inactivación microbiana, esto a todas las concentraciones de cloruro de sodio estudiadas y adicionadas al medio de referencia.

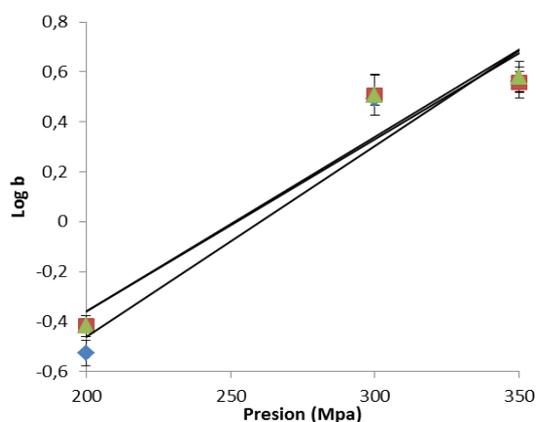


FIGURA 4. Ajuste lineal del logaritmo del parámetro b del modelo de Weibull, a concentraciones de NaCl (♦) 0,1%, (■) 0,5%, (▲) 0,8%, a las presiones de tratamiento

Se calculó el valor z de presión (z_p), definido como la inversa negativa de la pendiente de la recta que enfrenta el \log_{10} de b frente a la Presión (figura 4). Los valores de z_p se presentan en la tabla 2, siendo necesario incrementar el nivel de la Presión en 140 MPa para disminuir 1 unidad el logaritmo de b . En estudios anteriores realizados por Basak et al. (2002) y Zook et al. (1999) con *Saccharomyces cerevisiae* en diversas matrices como zumo de manzana, buffer fosfato y zumo de naranja, a un pH de 5, se obtuvieron valores de z_p de 115, 120 y 135 MPa respectivamente, datos similares a los obtenidos en el presente estudio.

TABLA 2. Valor z de presión (z_p) para *R. glutinis* a presiones de 200, 300, 350MP y concentraciones de 0,1, 0,5, 0,8 % NaCl a temperatura de tratamiento de 20°C.

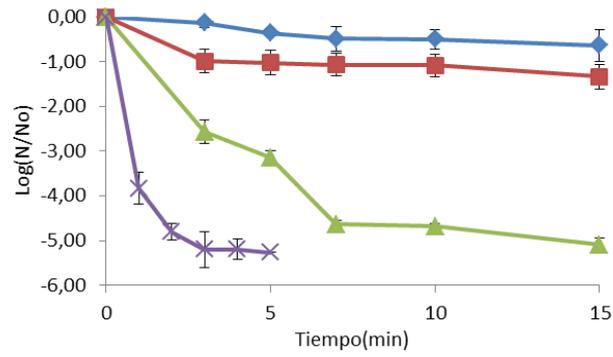
Concentración NaCl (g/100ml)	Valor z_p
0,1	129,8701
0,5	144,9275
0,8	142,8571

Efecto altas presiones Hidrostáticas sobre *P. aurantiogriseum* en medio referencia agua de peptona tamponada

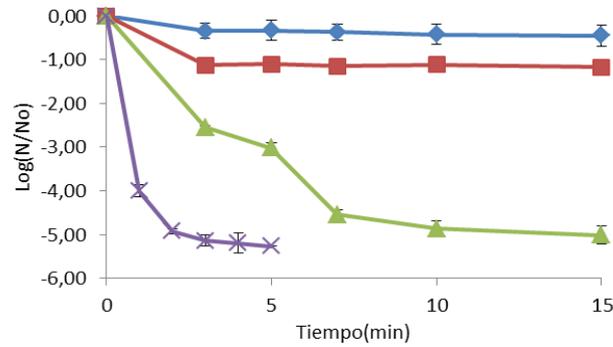
En cuanto al tratamiento con APH para las esporas de *P. aurantiogriseum* se observó que estas presentaban una mayor resistencia a las altas presiones que las levaduras tratadas anteriormente, ya que a tratamientos de 200-300 MPa se produjo únicamente una ligera reducción cercana a 1 ciclo logarítmico (Figura 5). La inactivación se incrementó a partir de los 350MPa para todas las concentraciones de NaCl, con un valor promedio máximo de 4.5 ciclos logarítmicos de inactivación a un tiempo de 10 minutos. Sin embargo al incrementar la presión a 400MPa la viabilidad de las esporas de *P. aurantiogriseum* se redujo drásticamente. Niveles de inactivación de 4 unidades logarítmicas se alcanzaron para 400 MPa - 1 min, aumentando el nivel de inactivación al incrementar el tiempo de tratamiento, hasta un máximo de $5.20 \pm 0,08$ unidades logarítmicas tras 3 minutos de tratamiento a 400 MPa.

Estudios previos en relación a la resistencia de esporas de *Penicillium spp.* tratadas por APH han sido publicadas por otros autores (Akdemir Evrendilek et al., 2008; Voigt et al., 2010), alcanzando niveles máximos de inactivación de 3 a 6 ciclos \log_{10} bajo condiciones (300 MPa - 5 min, 25°C, pH 4,9) (600 MPa - 10 min, 20°C, pH 4,5) respectivamente, de acuerdo a estudios previamente publicados por O'Reilly et al., 2000, donde se demostraba el efecto del tratamiento por APH sobre la cepa de *P. roqueforti* en diversas matrices, aunque con tiempos de tratamiento relativamente elevados (≥ 20 minutos), alcanzando niveles máximos de inactivación de 6 ciclos \log_{10} . En la presente investigación los resultados han sido similares, mostrando una reducción ≈ 6 ciclos \log_{10} para la presión de 400MPa, incluso con tiempos de tratamiento muy inferiores a 20 minutos. Sin embargo, cuando se incrementó el tiempo, y superó los 3 minutos, no produjo una mayor reducción celular que la obtenida con el tratamiento de 400 MPa a 3 minutos (curvas de supervivencia con colas), con una temperatura inicial de tratamiento de 20°C.

(A)



(B)



(C)

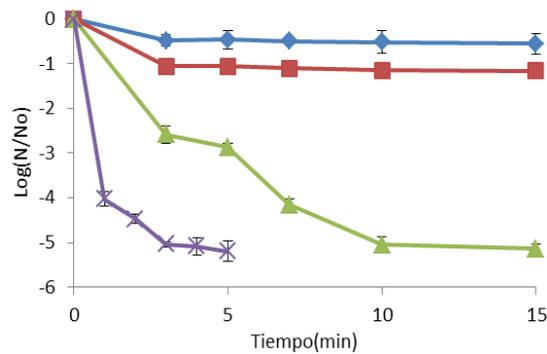
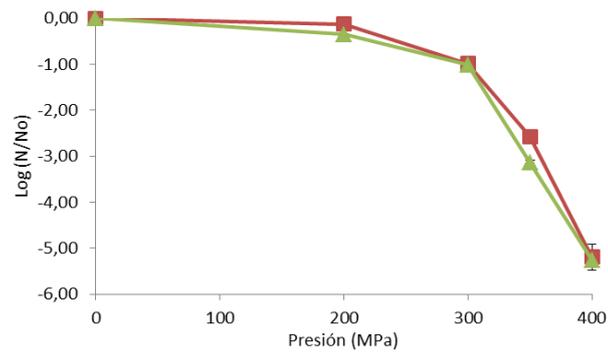


FIGURA 5. Inactivación de *P. aurantiigriseum* en agua de peptona a diferentes tiempos, concentraciones de NaCl (A) 0,1%, (B) 0,5%, (C) 0,8% y presiones (◆) 200, (■) 300, (▲) 350 (x) 400 MPa, a temperatura de tratamiento de 20°C

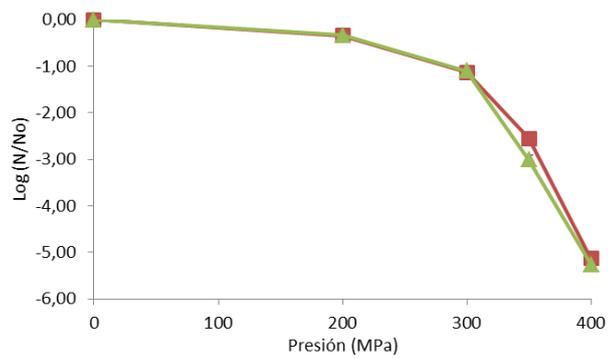
En cuanto al efecto de la concentración de cloruro de sodio en el medio de referencia, se observan resultados similares a los obtenidos con la levadura *R. glutinis*, evidenciando nuevamente que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles de inactivación alcanzados por APH, para cada una de las concentraciones de cloruro de sodio estudiadas, a las diferentes presiones y tiempos de tratamiento. Por tanto no se presenta una interacción directa entre la concentración de cloruro de sodio, y la disminución de la carga microbiana; como se puede observar en la figura 6, para los tiempos de 3 y 5 minutos comunes en todos los tratamientos.

Según los estudios publicados por Koseki et al. (2007) el efecto baroprotector del cloruro sódico se presenta en concentraciones superiores al 15%, llegando incluso a neutralizar por completo el efecto de las altas presiones hidrostáticas. Con lo expresado anteriormente se confirma que el cloruro sódico a bajas concentraciones, como las utilizadas en el presente estudio [0,1-0,8%], en medio de referencia no presenta un efecto baroprotector.

(A)



(B)



(C)

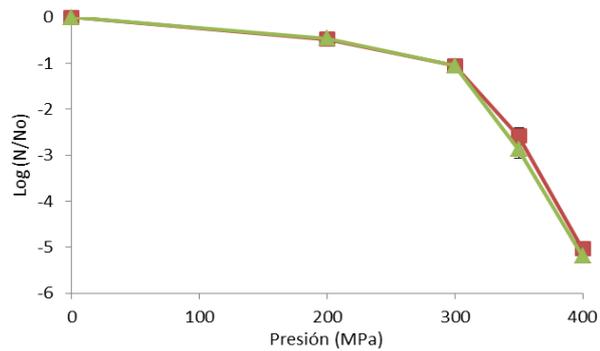


FIGURA 6. Efecto del cloruro de sodio en el tratamiento de altas presiones, en la inactivación de *P. aurantiogriseum* en medio referencia agua de peptona a tiempos (■) 3, (▲) 5 minutos y concentraciones de NaCl (A) 0,1%, (B) 0,5%, (C) 0,8% a temperatura de tratamiento de 20°C.

Modelización Matemática

Al igual que en el tratamiento anterior los datos experimentales se ajustaron a diferentes modelos matemáticos de acuerdo a estudios bibliográficos (Van Boekel, 2002; Peleg, 2000; Xiong et al., 1999; Bigelow, 1921) (datos no mostrados). La elección del modelo a utilizar se basó en 3 criterios fundamentales: (i) adecuación del modelo a los datos experimentales (bondad del ajuste); (ii) simplicidad del modelo; (iii) versatilidad del modelo. De acuerdo a estos criterios, el modelo de Weibull, capaz de ajustar curvas lineales, cóncavas (con colas) y convexas (con hombros), proporcionó el mejor ajuste a los datos experimentales. Como se puede observar en la tabla 3 el parámetro b del modelo de Weibull, presenta un aumento a medida que se incrementa la intensidad de tratamiento. Por lo tanto, este parámetro se puede considerar como un parámetro cinético en la inactivación de la *P. aurantiogriseum* por APH. Por otra parte se observó que a medida que se incrementaba la presión, el parámetro b aumentaba de forma paulatina, indicando mayor rapidez en la inactivación de las esporas. En cuanto a los valores de n se observó que en todos los casos eran <1 , indicando la concavidad de las curvas, con la existencia de colas, esporas supervivientes a tiempos largos, que pueden ser más resistentes a los tratamientos.

TABLA 3. Valores del parámetro b y n del modelo de Weibull, valores de R-squared y MSE en las curvas de supervivencia de *P. aurantiogriseum* a diferentes presiones

Presión Mpa	Concentración % NaCl	Weibull		R-Squared	MSE
		b	n		
200	0,1	0,1095	0,6626	93,7592	0,0045
	0,5	0,2533	0,2089	99,0282	0,0003
	0,8	0,4127	0,1005	99,5024	0,0002
300	0,1	0,7634	0,1842	98,5657	0,0038
	0,5	1,0961	0,0175	99,8030	0,0005
	0,8	0,9562	0,0729	99,8803	0,0003
350	0,1	1,8039	0,4030	96,1759	0,1753
	0,5	1,7506	0,4145	95,5619	0,2051
	0,8	1,5848	0,4580	96,5225	0,1634
400	0,1	4,0497	0,1850	99,1195	0,0465
	0,5	4,2096	0,1563	99,3316	0,0353
	0,8	4,0522	0,1649	99,7675	0,0115

Para la cinética de inactivación de *P. aurantiogriseum* a diferentes presiones y concentraciones de NaCl, el parámetro b del modelo de Weibull presentó una tendencia lineal (Figura 7), demostrando que un incremento en la presión de tratamiento, incrementaba la velocidad de inactivación microbiana, esto se observó para todas las concentraciones de cloruro de sodio estudiadas.

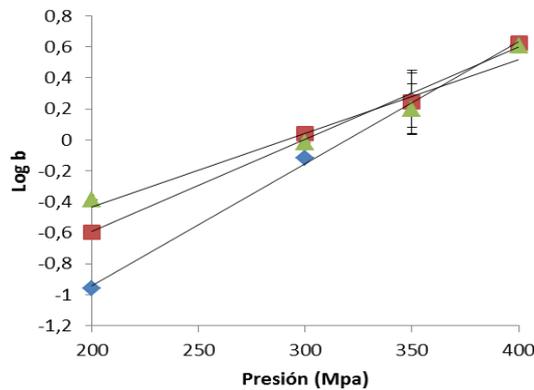


FIGURA 7. Ajuste lineal del logaritmo del parámetro b del modelo de Weibull ($\log_{10} b$), a concentraciones de NaCl (◆) 0.1%, (■) 0.5%, (▲) 0.8%, a las presiones de tratamiento estudiadas.

Igualmente se realizó el cálculo del valor z_p , este se define como la inversa negativa de la pendiente de la recta enfrentando el \log_{10} de b frente a la Presión de trabajo (figura 7). Los valores de z_p se presentan en la tabla 4, siendo necesario incrementar el nivel de la Presión en 187 MPa para disminuir 1 unidad el logaritmo de b .

Por tanto al realizar la comparación de los valores de z_p obtenidos para los dos microorganismos, se demuestra una mayor sensibilidad de la levadura *R. glutinis* ($Z=140$) con respecto a las esporas de *P. aurantiogriseum* ($Z=187$) a temperatura de 20°C y pH de 6,5 para los diferentes tratamientos con APH. Sin embargo en estudios realizados por O'Reilly et al. (2000) con esporas de *P. roqueforti* IMI 297987 en una matriz alimentaria, queso a pH 5,2, se obtuvo un valor $z_p=95$ MPa, siendo inferior al obtenido en el presente estudio. Estas diferencias en el valor z de presión pueden ser debidas a varios factores: la matriz, el pH y a las características propias de las cepas utilizadas, ya que las cepas aisladas de alimentos o de muestras ambientales presentan generalmente una mayor baroresistencia que aquellas que provienen de cultivos tipo (Cheftel, 1995)

TABLA 4. Valor z de presión (z_p) para *P. aurantiogriseum* a presiones de 200, 300, 350, 400MP y concentraciones de 0.1, 0.5, 0.8 % NaCl a temperatura de tratamiento de 20°C.

Concentración NaCl (g/100ml)	Valor Z_p
0,1	142,8571
0,5	166,6667
0,8	250

CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que los tratamientos con altas presiones hidrostáticas en torno a los 350 - 400 MPa son efectivos para controlar la presencia de microorganismos alteradores como *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum*, respectivamente, a temperatura de 20°C. En cuanto al efecto del cloruro sódico en el tratamiento con APH, no se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de inactivación alcanzados por APH para cada una de las concentraciones estudiadas (0,1-0,5-0,8%), y para todos los tratamientos (P-t), por tanto se puede concluir, que en nuestro estudio, la concentración de cloruro sódico no puede considerarse como un factor adicional de control para *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum* tratadas por APH.

El modelo de Weibull presentó un buen ajuste a los datos experimentales de inactivación en medio de referencia. Los parámetros cinéticos del modelo, nos proporcionan información sobre el comportamiento del microorganismo, así como de los parámetros de proceso (P, t) y de sustrato (adición de NaCl) más influyentes en la sensibilidad/resistencia microbiana. En estudios posteriores sería de gran interés validar el modelo ajustado al tratamiento de células de *R. glutinis* y *P. aurantiogriseum* en sustrato real (por ejemplo, en queso de bajo contenido en sal) y no sólo para microorganismos alteradores, sino también patógenos.

El presente estudio contribuye al estado del conocimiento en cuanto al futuro procesado por APH de productos sensibles a procesos térmicos típicos de pasteurización, en cuanto a preservar la calidad del producto tratado y prolongar su vida útil.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Instituto Alpina de Colombia, con la finalidad de apoyar la Investigación, Desarrollo e innovación.

REFERENCIAS

- Amiali, M.; Ngadi, M.O.; Smith, J.P; Raghavan,G.S.V. 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. Journal of Food Engineering, **79**: 689–694.
- Akdemir Evrendilek, G.; Koca, N.; Harper, J. W.; Balasubramaniam V.M. 2008. High-Pressure Processing of Turkish White Cheese for Microbial Inactivation. Journal of Food Protection, **71(1)**:102-108.
- Barbosa- Cánovas, G.V.; Gongora- Nieto, M.; Pothakamury U.; Swanson B. 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields. 5-10, Academic Press, San Diego,USA.

- Basak, S.; Ramaswamy, H.S.; Piette, J.P.G. 2002. High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **3**: 223-231.
- Bigelow, W.D. 1921. *The logarithmic nature of thermal death time curves*. *Journal Infectious Diseases*, **29**: 528-536.
- Buzrul, S.; Alpas, H.; Bozoglu, F. 2005. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Research International*, **38**: 151–157.
- Chevalier, D.; Le Bail, A.; M. Ghoul. 2001. Effects of high pressure treatment (100–200 MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle. *Food Research International*, **34**: 425-429.
- Chen, H.; Hoover, D. G. 2004. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **5**: 269– 276.
- Collado, J.; Fernández A.; Rodrigo, M.; Camats, J.; Martínez López, A. 2003. Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*, **20**:545–548.
- Coroller, L.; Kan-King-Yu, D.; Leguerinel, I.; Mafart, P.; Membré, J.M. 2012. Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation areas of *Listeria* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **152**:139–152.
- Donsì, F.; Annunziata, M.; Ferrar, G. 2013. Microbial inactivation by high pressure homogenization: Effect of the disruption valve geometry *Journal of Food Engineering*, **115**: 362-370.
- Duranton, F.; Guillou, S.; Simonin, H.; Chéret, R.; Lamballerie M. 2012. Combined use of high pressure and salt or sodium nitrite to control the growth of endogenous microflora in raw pork meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **16**: 373–380.
- Elez-Martinez, P.; Suarez-Recio, M.; O. Martin-Belloso. 2007. Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, **78**: 184-193.
- Evert-Arriagada, K.; Hernández-Herrero, M.M.; Juan, B.; Guamis, B.; Trujillo A.J. 2012. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering* **110**: 248–253.
- Fernandez, A.; Collado, J.; Cunha, L.M.; Ocio, M.J.; Martínez, A. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology*, **77**:147-153
- Igual, M.; Sampedro, F.; Martínez-Navarrete, N.; Fan, X. 2013. Combined osmodehydration and high pressure processing on the enzyme stability and antioxidant capacity of a grapefruit jam. *Journal of Food Engineering*, **114**: 514-521
- Koseki, S.; Yamamoto, K. 2007. Water activity of bacterial suspension media unable to account for the baroprotective effect of solute concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, **115**: 43-47

- O'Reilly, C.E.; O'Connor, P.M.; Kelly, A.L.; Beresford, T.P.; Murphy, P.M. 2000. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:4890-4896
- Peleg, M. 2000. Microbial survival curves—the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International*, **33**: 531–538.
- Pina-Pérez, C.; Rodrigo Aliaga, D.; Saucedo-Reyes, D.; Martínez-López, A. 2007. Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakasaki* in infant formula milk. *Journal of Food Protection*, **70**: 2281–2289.
- Pina-Pérez, C.; Silva-Angulo, A.B.; Rodrigo Aliaga, D.; Martínez-López, A. 2012. A preliminary exposure assessment model for *Bacillus cereus* cells in a milk based beverage: Evaluating High Pressure Processing and antimicrobial interventions. *Food Control*, **26**: 610-613.
- Polydera, A.C.; Stoforos N.G.; Taoukis, P.S. 2003. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, **60**: 21–29.
- Ratphitagsanti, W.; Ahn, J.; Balasubramaniam, V.M.; Yousef, A.E. 2009. Influence of pressurization rate and pressure pulsing on the inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores during pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Protection*, **72(4)**: 775-782.
- Rodrigo, D.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martínez, A.; Rodrigo, M. 2003. Pectinmethylesterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, **66**:2336-2342.
- Rosaria Corbo, M.; Lanciotti, R.; Albenzio, M.; Sinigaglia, M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology*, **69**: 147–152.
- Sampedro, F.; Rivas, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A.; Rodrigo, M. 2006. Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice–milk beverage. *European Food Research and Technology*, **223**:30-34.
- Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, **9**: 152–158.
- Torres, E.F.; Bayarri, S.; Sampedro, F.; Martínez, A.; and Carbonell, J.V. 2008. Improvement of the Fresh Taste Intensity of Processed Clementine Juice by Separate Pasteurization of its Serum and Pulp. *Food Science and Technology International*, **14(6)**: 525 - 529.
- Van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal Food Microbiology*, **74**: 139-159.
- Voigt, D. D.; Chevalier, F.; Qian, M. C.; K, A. L. 2010. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 68–77.
- Xiong, R.; Xie, G.; Edmondson, A. S.; Linton, R.H.; Sheard, M.A. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology*, **16**:269-279.