



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
DE VERACRUZ**

Desarrollo y Aplicación de un Sistema en Continuo Para la  
Inactivación de Microorganismos Mediante Fluidos  
Supercríticos Asistidos por Ultrasonidos de Potencia

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Ingrid Paniagua Martínez**

Dirigida por:

**Dr. D. José Javier Benedito Fort**

**Dr. D. Antonio Mulet Pons**

**Dr. D. Miguel Ángel García Alvarado**

**Valencia, España, Junio 2017**



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
DE VERACRUZ

D. JOSÉ JAVIER BENEDITO FORT, D. ANTONIO MULET PONS PROFESORES CATEDRÁTICOS DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA Y D. MIGUEL ÁNGEL GARCÍA ALVARADO PROFESOR CATEDRÁTICO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “Desarrollo y aplicación de un sistema en continuo para la inactivación de microorganismos mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia”, presentada por Dña. Ingrid Paniagua Martínez para aspirar al grado de Doctora en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València y en el Instituto Tecnológico de Veracruz de acuerdo a un convenio de cotutela firmado entre ambas instituciones, cumple las condiciones adecuadas para su aceptación como Tesis Doctoral, por lo que

AUTORIZAN:

A la interesada a su presentación en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos la referida memoria firmando el presente certificado en Valencia a 18 de mayo de 2017.

Fdo. Dr. José Javier Benedito Fort

Fdo. Dr. Antonio Mulet Pons

Fdo. Dr. Miguel Ángel García Alvarado

*A Dios por regalarnos cada día un nuevo amanecer, dándonos la oportunidad para ser felices.*

*A mi mamá y papá por su inmenso amor. GRACIAS por su alegría, optimismo y perseverancia, con las cuales me inyectan de fe y esperanza, motivándome a luchar por hacer realidad mis sueños.*



## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por financiar mis estudios doctorales dentro del Programa Nacional de Becas.

A la Generalitat Valenciana a través del proyecto PROMETEOII/2014/0005, por la financiación recibida para el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral.

***Estos años no solo me permitieron obtener un título de doctorado, también me han dejado las mejores lecciones de vida, gracias a todos los que con sus sonrisas alegraban mis mañanas, tardes o noches motivándome a seguir.***

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. José Benedito, quien no sólo se ha comportado como un extraordinario director de tesis en el aspecto académico, sino, que se ha vuelto un guía fundamental para concretar este proyecto. Gracias doctor desde el fondo de mi corazón por creer en mí siempre y por comprometerse tanto. Le estaré agradecida de por vida.

Al Dr. Antonio Mulet Pons por su invaluable asesoría, pero sobre todo, por aceptarme para formar parte del grupo de investigación ASPA y darme todas las facilidades para desarrollar mi proyecto. Gracias Dr. por la alegría que inyecta al grupo y que hace que no solo sea un grupo de trabajo, sino que se convierta en una familia.

Al Dr. Miguel Ángel García Alvarado, por sus enseñanzas, su valiosa asesoría en la realización de este proyecto, pero sobre todo por su apoyo incondicional y porque siempre con su trato ameno y cordial nos impulsa a seguir adelante.

Gracias infinitas a Ramón Peña, quien me compartió tanto de su conocimiento y que siempre me apoyó incondicionalmente con el buen funcionamiento del equipo, “ay, esa bomba como nos hizo sufrir”, pero gracias Ramón porque a pesar del arduo trabajo que siempre tenías, en todo momento llegabas con tu buen humor a auxiliarme, tus enseñanzas me hicieron más pensante, ahora sé que no son necesarias grandes y sofisticadas herramientas para solucionar averías, la imaginación es la mejor aliada.

Gracias Nieves por todos los conocimientos que compartiste conmigo, puedo decir que me formé con la mejor técnica de laboratorio, pero ante todo, gracias por la alegría que siempre inyectabas a mi trabajo, realmente añoro esas épocas, donde más que trabajar era un placer estar varias horas del día en el laboratorio, el cual se convertía en una casa, donde cada día era un aprendizaje.

Quiero agradecer a toda la familia ASPA, quienes me acogieron con todo cariño y me hicieron sentir siempre en casa. Gracias por regalarme unos maravillosos años.

Gracias a todos mis maestros de la UNIDA por sus enseñanzas, las cuales me han ido cultivando como estudiante, pero sobre todo como ser humano.

Gracias a todos los amig@s que me han acompañado en este viaje, Gracias por ser mis compañeros de aventuras, alegrías, buenos y no tan buenos momentos. Siempre le doy gracias a dios por haberme permitido encontrarlos en este camino de la vida. Gracias a los amigos que estuvieron en Valencia y que prevalecen al día de hoy, su cariño me hacía sentir acogida siempre, estar lejos de mi familia no hubiera sido fácil sin ustedes. Gracias a mis entrañables amigos, quienes siempre me esperaron en México, y que a pesar de la distancia, siempre estuvieron tan cerca.

Gracias a mi nueva familia quienes me alienta cada día a seguir, sin su amor y cariño nada sería igual, los amo con todo mi corazón.



*Cuando Dios te da un sueño,  
es porque al despertar podrás contar con el  
para hacerlo realidad.....*

*Lucha por todo aquello que te saque una sonrisa*





## INDICE GENERAL

ABSTRACT		II
RESUMEN		VI
RESUM		X
1. INTRODUCCIÓN		
1.1	Generalidades de los fluidos supercríticos	3
1.2	Propiedades de los fluidos supercríticos	5
	1.2.1 Densidad de los fluidos supercríticos	7
	1.2.2 Viscosidad de los fluidos supercríticos	8
	1.2.3 Difusividad de los fluidos supercríticos	8
	1.2.4 Solubilidad de los fluidos supercríticos	9
1.3	Empleo del CO <sub>2</sub> supercrítico como técnica no térmica de inactivación microbiana	9
	1.3.1 Efecto del CO <sub>2</sub> supercrítico sobre la inactivación de células bacterianas, formas vegetativas de hongos y levaduras	10
1.4	Mecanismos de inactivación microbiana mediante el empleo de CO <sub>2</sub> supercrítico	12
	1.4.1 Disolución del CO <sub>2</sub> presurizado en la fase líquida	13
	1.4.2 Difusión del CO <sub>2</sub> y modificación de la membrana celular	13
	1.4.3 Penetración del CO <sub>2</sub> en el interior de la célula y disminución del pH intracelular	13
	1.4.4 Inhibición del metabolismo celular debido a la inactivación de enzimas	14
	1.4.5 Inhibición directa del metabolismo celular en respuesta a la presencia del CO <sub>2</sub> y formación de HCO <sup>3-</sup>	14

1.4.6	Desequilibrio de los electrolitos intracelulares	14
1.4.7	Extracción de los componentes intracelulares y ruptura celular	14
1.5	Combinación de SC-CO <sub>2</sub> con tecnologías no térmicas de conservación	14
1.6	Generalidades de los ultrasonidos	15
1.6.1	Sistemas de generación de ultrasonidos de potencia	18
1.6.2	Efectos de los ultrasonidos de potencia	19
1.6.3	Aplicación de los HPU en procesos de inactivación microbiana	21
1.6.4	Aplicación de la combinación de SC-CO <sub>2</sub> y HPU	22
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	33
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1	Plan de trabajo	36
3.2	Equipo de fluidos supercríticos asistido con ultrasonidos de potencia (SC-CO <sub>2</sub> -HPU) existente en el grupo ASPA. Trabajo por lotes.	38
3.3	Equipo de fluidos supercríticos asistido con ultrasonidos de potencia (SC-CO <sub>2</sub> -HPU) en sistema en continuo	42
3.4	Preparación del cultivo e inóculo	44
3.5	Viabilidad de los microorganismos	45
3.6	Materia prima	46
3.7	Procesamiento térmico	47
3.8	Análisis físico-químicos	48
3.8.1	pH	48
3.8.2	° Brix	48
3.8.3	Acidez titulable	49
3.8.4	Nube	49

3.8.5	Índice de pardeamiento	50
3.8.6	Color	51
3.8.7	Ácido ascórbico	51
3.8.8	Capacidad antioxidante FRAP	52
3.8.9	Compuestos fenólicos	52
3.9	Estabilidad durante el almacenamiento	53
3.10	Modelo Estadístico	53
3.11	Análisis Estadístico	55
4.	RESULTS AND DISCUSSION	56
	<b>CHAPTER 1</b>	57
	“Desing construction and set-up of the ultrasound-assisted supercritical CO <sub>2</sub> continuous flow system”	
	<b>CHAPTER 2</b>	68
	“Ultrasound-assisted supercritical CO <sub>2</sub> treatment in continuous regime: application in <i>S. cerevisiae</i> inactivation”	
	<b>CHAPTER 3</b>	97
	“Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of orange juice using a continuous flow ultrasound assisted supercritical CO <sub>2</sub> system	
	<b>CHAPTER 4</b>	126
	“Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of pineapple juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO <sub>2</sub> system”	
5.	CONCLUSIONES	142
6.	RECOMENDACIONES	146
7.	CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS	148

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1.	Diagrama de fases de un compuesto puro	4
FIGURA 1.2.	Variación de la densidad del CO <sub>2</sub> con la presión reducida en los alrededores del punto crítico.	7
FIGURA 1.3.	Comportamiento de la viscosidad del CO <sub>2</sub> a diferentes temperaturas, en función de la presión.	8
FIGURA 1.4.	Clasificación de las ondas elásticas en función de la frecuencia	18
FIGURA 1.5.	Efecto piezoeléctrico	19
FIGURA 1.6.	Formación y crecimiento de burbujas de cavitación	20
FIGURA 3.1.	Plan de trabajo	37
FIGURA 3.2.	Equipo de fluidos supercríticos asistido por ultrasonidos de potencia en sistema discontinuo. 1. Tanque CO <sub>2</sub> ; 2. Tanque de N <sub>2</sub> ; 3. Reserva de CO <sub>2</sub> ; 4. Bomba de CO <sub>2</sub> ; 5. Baño termostático; 6. Depósito de tratamiento; 7. Sonda de temperatura; 8. Transductor; 9. Junta de aislamiento; 10. Cerámicas; 11. Soporte de teflón; 12. Generador de ultrasonidos; 13. Salida para la toma de muestras; 14. Bomba auto-aspirante de recirculación; P: manómetros; T: sensores de temperatura; V: válvulas.	38
FIGURA 3.3.	Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU) <b>A.</b> Vista Real. <b>B.</b> Esquema: 1. Conector de entrada de potencia; 2. Junta de cierre; 3. Soporte de aluminio; 4. Cerámicas; 5. Sonotrodo de aluminio.	41
FIGURA 3.4.	Equipo de fluidos supercríticos asistido por ultrasonidos de potencia en sistema en continuo. 1. Tanque CO <sub>2</sub> ; 2. Tanque de N <sub>2</sub> ; 3. Reserva de CO <sub>2</sub> ; 4. Bomba de CO <sub>2</sub> ; 5. Depósito muestra a tratar; 6. Bomba de líquido; 7. Punto de mezcla; 8. Depósito de sonicación; 9. Sonotrodo; 10. Sistema de aislamiento; 11. Cerámicas; 12. Generador de ultrasonidos; 13. Baño termostático; 14. Tubo de contacto; 15. Depósito de separación; 16. Muestra; 17. Recirculación de CO <sub>2</sub> ; 18. Salida del depósito de sonicación; 19. Salida del depósito de Separación; P: manómetros; T: sensores de temperatura; V: válvulas.	42

FIGURA 3.5.	Extractor de zumo Ultra juicer	47
FIGURA 3.6	Pasteurizador (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain)	47
FIGURA 3.7.	Medidor digital de pH	48
FIGURA 3.8.	Refractómetro digital	49
FIGURA 3.9.	Espectrofotómetro UV-visible empleado para evaluar cambios en la nube .	50
FIGURA 3.10.	Colorímetro	51
FIGURA C.1.1.	Supercritical CO <sub>2</sub> batch treatment system existing in the ASPA group	58
FIGURA C.1.2.	Supercritical CO <sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO <sub>2</sub> tank; 2. N <sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO <sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Holding contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO <sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.	59
FIGURA C.1.3.	Pictures of the added elements in the supercritical CO <sub>2</sub> continuous treatment system. 6. Liquid Pump; 14. Continuous contact tube; 15. Separation vessel; 17. CO <sub>2</sub> Recirculation; 19. Separation vessel output, V. valve; VM. micrometric valve; P. Manometer	60
FIGURA C.2.1.	Supercritical CO <sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO <sub>2</sub> tank; 2. N <sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO <sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Holding contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO <sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.	74

- FIGURA C.2.2. Modeled (Eq. (8)) *S. cerevisiae* inactivation 81  
 $(y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right))$  using a HPU assisted supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system at 31 °C in sonication vessel. Effect of juice flow (x<sub>1</sub>) and pressure (x<sub>3</sub>). a) with ultrasound; b) without ultrasound.
- FIGURA C.2.3. Modeled (Eq. (8)) *S. cerevisiae* inactivation 82  
 $(y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right))$  using a HPU assisted supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system at 31 °C in separator. Effect of juice flow (x<sub>1</sub>) and pressure (x<sub>3</sub>). a) with ultrasound; b) without ultrasound. Resultados de la matriz inversa con dos tamaños de lecho
- FIGURA C.2.4. Effect of juice residence time on *S. cerevisiae* inactivation 85  
 $(y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right))$  at 300 bar and 31 °C. Experimental data: SC-CO<sub>2</sub> (O) and SC-CO<sub>2</sub>-HPU (x). Modeled (Eq. (8); continuous line). a) Sonication vessel; b) separator.
- FIGURA C.2.5. Effect of temperature on *S. cerevisiae* inactivation 86  
 $(y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right))$  at 100 bar and 15 mL/min (4.6 min residence time). Experimental data: SC-CO<sub>2</sub> (O) and SC-CO<sub>2</sub>-HPU (x). Modeled (Eq. (8); continuous line). a) Sonication vessel; b) separator
- FIGURA C.2.6. Effect of temperature on *S. cerevisiae* in activation 89  
 $(y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right))$  at 200 bar and 15mL/min (4.6 min residence time). Experimental data: SC-CO<sub>2</sub> (O) and SC-CO<sub>2</sub>-HPU (x). Modeled (Eq. (8); continuous line). a) Sonication vessel; b) separator

FIGURA C.3.1.	Supercritical CO <sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO <sub>2</sub> tank; 2. N <sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO <sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Holding contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO <sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.	104
FIGURA C.3.2.	Loss of phenolic compounds content in orange juice after different treatment conditions	112
FIGURA C.3.3.	Percentage variation of antioxidant capacity in orange juice at different conditions of treatment	113
FIGURA C.3.4.	Percentage variation of cloud in orange juice at different conditions of treatment	120
FIGURA C.3.5.	Percentage variation of ascorbic acid in orange juice at different conditions treatment	121
FIGURA C.4.1.	Supercritical CO <sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO <sub>2</sub> tank; 2. N <sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO <sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Holding contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO <sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.	131



## LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1.	Comparación de propiedades de gases, líquidos y fluidos supercríticos	6
TABLA 3.1	Flujo de líquido tratado obtenido a diferentes presiones y posiciones de medición de la bomba	44
TABLA C.1.1.	Flow of treated liquid obtained at different pressures and pump metering positions	61
TABLA C.1.2.	Reduction ( $\log(N/N_0)$ ) of <i>S. cerevisiae</i> inoculated in YPD Broth ( $1 \times 10^7$ cfu/mL) and treated with SC-CO <sub>2</sub> and SC-CO <sub>2</sub> -HPU in continuous mode at 31 °C and constant flow of CO <sub>2</sub> (5 mL/min).	64
TABLA C.1.3.	Reduction ( $\log(N/N_0)$ ) of <i>S. cerevisiae</i> inoculated in apple juice ( $1 \times 10^7$ cfu/mL) and treated with SC-CO <sub>2</sub> and SC-CO <sub>2</sub> -HPU in continuous mode at 31 °C and constant flow of CO <sub>2</sub> (5 mL/min)	65
TABLA C.2.1.	Experimental design performed to analyze the effect of pressure, temperature, use of ultrasound, residence time in the sonication vessel ( $\tau_{SoV}$ ) and the total residence time ( $\tau_{ToT}$ ) on <i>S. cerevisiae</i> inactivation	76
TABLA C.2.2.	Parameters of the model (Equation (8)) used to describe the effect of pressure, temperature, residence time and use of ultrasound on the inactivation of <i>S. cerevisiae</i> using SC-CO <sub>2</sub> -HPU	79
TABLA C.2.3.	Optimization results in the sonication ( $y_{SoV}$ ) and separation vessels ( $y_{SeV}$ ), calculated to minimize the residence time (problem 1) and to maximize the microbial inactivation (problem 2)	92
TABLA C.3.1.	Inactivation of microbiota in orange juice at different operating conditions	108

TABLA C.3.2.	pH, °Brix and titrable acidity values for different operating conditions	111
TABLA C.3.3.	Browning index values of orange juice processed at different conditions	115
TABLA C.3.4.	Color values of orange juice processed at different conditions	116
TABLA C.4.1.	Inactivation of microbiota ( $\log(N_0)$ ) in pineapple juice at different residence times (3.06 and 4.6 min)	134
TABLA C.4.2.	Effect of the SC-CO <sub>2</sub> -HPU continuous treatment on pH, °Brix, and Vit. C for different juice residence times (3.06 and 4.6 min)	136
TABLA C.4.3.	Analysis of vitamin C during refrigerated storage (4 weeks) of SC-CO <sub>2</sub> -HPU treated (at two different residence times) and control pineapple juices	138

# **ABSTRACT/RESUMEN/RESUM**

---

---

**ABSTRACT**

Food is prone to be transformed either by biochemical reactions or by the action of microorganisms that modify their original characteristics causing its spoilage. In this regard, thermal treatments are used to extend the shelf life of food. However, these methods, which use high temperatures, may alter the sensory and nutritional properties of food.

Therefore, along with the demand of consumers of fresh and natural foods, there is an increasing interest in non-thermal preservation techniques. The aim of these new technologies is to ensure the preservation of food while maintaining its nutritional value and organoleptic properties. An example of these methods is given by the use of supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>). Different authors have reported the inactivation of enzymes and microorganisms as a result of SC-CO<sub>2</sub>. Moreover, this technique minimally alters the sensory and nutritional properties of foods.

Microorganisms whose inactivation by SC-CO<sub>2</sub> has been studied include Gram-negative bacteria such as *Salmonella typhimurium*, *E. coli* or *Yersinia enterocolitica*, to gram-positive bacteria such as *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* or yeasts and fungi. In most studies, it has been observed that gram-positive cells are more resistant than gram-negative bacteria; this difference is attributed to the greater cell wall thickness of gram-positive bacteria compared to gram-negative ones. The yeast *S. cerevisiae* has a cell wall similar to that observed in gram-positive bacteria which explains its higher resistance against inactivation treatments analogous to that observed on gram-positive bacteria.

Some authors have also studied the effect of SC-CO<sub>2</sub> in a continuous system, observing larger reductions in these systems compared to discontinuous SC-CO<sub>2</sub> systems.

On the other hand, the use of supercritical fluids assisted with high power ultrasound (HPU) allows vigorous agitation and a rapid dissolution of CO<sub>2</sub> into the medium. Consequently, the rate of the inactivation mechanisms associated with supercritical CO<sub>2</sub> (quick fall of intracellular pH, the increase in mass transfer, and an improvement on the extraction of vital intracellular components of cells) also increases.

This technology has been mainly developed in a discontinuous system presenting important reductions on the time of microbial inactivation compared to using only supercritical fluids. However, the food industry requires continuous systems to process large quantities of product. On the other hand, the effect of the combination of SC-CO<sub>2</sub> and HPU on the quality of processed products has not been addressed in the literature.

In this context, the main purpose of the present Doctoral Thesis was to develop and apply a continuous system for the inactivation of microorganisms using supercritical fluids assisted with high power ultrasound (SC-CO<sub>2</sub>-HPU). Both, the microbial inactivation capacity of the technique and the effect of treatments on food quality were assessed.

The first stage of the project consisted on the retrofitting of a system for the inactivation of microorganisms that combines the use of supercritical fluids (SC-CO<sub>2</sub>) and ultrasound to convert its discontinuous (or batch) operation system into a continuous system. The above mentioned equipment (HPU) was available in the ASPA group (Grupo de Análisis y Procesos Agroalimentarios, Universitat Politècnica de València). At this stage, the necessary equipment was designed having as a premise the use of the largest possible amount of material available in the existing pilot plant as well as the maintenance of the safety conditions associated with the installation of a high pressure device. The design of the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU device took into account the need to extend the residence time of the supercritical CO<sub>2</sub>/product to be treated. Thus, a holding section was introduced. The installation phase involved the redistribution of all elements to adapt them to the new requirements of the equipment. Subsequently, the equipment was set up until the developed device could pump simultaneously, and under supercritical conditions, the CO<sub>2</sub> and a liquid.

The second stage of the project consisted on the analysis of the effect of the pressure, temperature and residence time on the inactivation of *S. cerevisiae* inoculated in commercial apple juice treated in the SC-CO<sub>2</sub>-HPU system developed as described previously. The juice was inoculated with a concentration of 10<sup>7</sup>UFC/mL, and then it was processed using the continuous SC-CO<sub>2</sub> equipment. Treatments were carried out with and without HPU, to evaluate the effect of HPU treatment on the quality parameters of the juice. The conditions used for the residence time, the temperature and the pressure were 3.06-9.2 min, 31-41°C, and 100-300 bars, respectively. The inactivation ratios were fitted to a hybrid model (Boolean-real) to study the effect of process variables. The maximum inactivation achieved by the system was 7.8 log-

cycles. The hybrid model demonstrated that the use of HPU has a significant effect on the inactivation of *S. cerevisiae* especially for short residence times. A multiobjective optimization with the hybrid model was also performed. Results showed that using HPU, 6.8 log-cycles of inactivation could be achieved after a minimum residence time (3.1 min) while, in the same conditions but without HPU, the inactivation achieved was only 4.3 log-cycles. Therefore, the ultrasonic assisted continuous system proved to be a technique with high potential for microbial inactivation while using SC-CO<sub>2</sub> under moderate process conditions.

In the third stage of the project, the product chosen was orange juice which is one of the processed juices most consumed worldwide. However, for its conservation, a heat treatment is required which causes significant organoleptic and nutritional changes. The orange juice was treated in the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU equipment, to verify the viability of its use as a method for its preservation and the possible reduction of the disadvantages attributed to thermal pasteurization. The conditions used for the residence time, the temperature and the pressure were 3.06 min, 31, 36 and 41 °C and 100 bar, respectively. The juice was also subjected to a conventional heat treatment (pasteurization) to compare the effect of SC-CO<sub>2</sub>-HPU and pasteurization treatments. Several parameters were measured after the treatments such as microbiota (mesophilic viable bacteria (MVC), *E. coli*, and *S. cerevisiae*), pH, °Brix, titratable acidity, phenolic compounds, antioxidant capacity, cloud, browning index, color and vitamin C concentration. The experimental results showed that the treatment by SC-CO<sub>2</sub>-HPU achieved the complete inactivation of the initial population of *E. coli* and total MVC; however, *S. cerevisiae* cells were not totally inactivated, although reductions of more than 99% were obtained. Also, changes below 1% on the pH and ° Brix and below 5% on the titratable acidity of the treated juice were observed after the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment. On the other hand, the SC-CO<sub>2</sub>-HPU technology induced a higher browning index (211%) and greater changes in juice color. It was possible to improve the juice cloud by 173%, and the loss of phenolic compounds (6.5%) and ascorbic acid (5.5%), compared to the thermally pasteurized juice. Likewise, an increase in the antioxidant capacity (12%) compared to the natural juice was also observed. Therefore, the proposed technology allows reducing some of the adverse effects on the quality parameters of the commercial juice attributed to the conventional thermal technology. These results suggest that its application at the industrial level can represent an alternative to the conventional thermal technology.

The fourth stage consisted on the evaluation of the effect of residence time (3.06-4.6 min) at 100 bars and 31°C on the quality and the microbiota of pineapple juice treated in the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU equipment. Also, the degradation of Vitamin C and the evolution of the microbiota of fresh and processed pineapple juice during storage at 4 °C were analyzed. Results indicated that the inactivation of the microbiota was complete and the differences in the quality attributes (2.2% for pH, 4.8% for ° Brix, 2% for Vitamin C) were small. During the storage, the microorganisms were not able to recover, and the decrease in vitamin C could be limited to 8.2% after four weeks. Thus, the results demonstrated that the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU technique could be an excellent alternative for the cold pasteurization of pineapple juice.

Finally, it can be concluded that the technique developed in the present Thesis has a great potential as a preservation method. Continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment involves mild processing conditions and reasonable processing times for the food industry, which would result in a limited impact on the nutritional and organoleptic properties of the treated products. Thus, the technique has proven to be effective in different fruit juices with different characteristics (apple, orange, and pineapple). On the other hand, further studies considering the effect of the developed technique on the organoleptic properties of the juices, through the sensory analysis of the treated samples, should be considered.

## 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 CO<sub>2</sub> en estado supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) es una de estas tecnologías. El SC-CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub> en un sistema en continuo, observando mayores reducciones comparando con sistemas de SC-CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> en el medio y por tanto un aumento en la velocidad de los mecanismos de inactivación asociados al CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub>-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-CO<sub>2</sub>) 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub>-HPU en continuo. Para ello el zumo fue inoculado con una concentración de células de 10<sup>7</sup> UFC/mL y fue tratado en el equipo de SC-CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub> 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-CO<sub>2</sub>-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-CO<sub>2</sub>-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-CO<sub>2</sub>-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-CO<sub>2</sub>-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-CO<sub>2</sub>-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-CO<sub>2</sub>-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.

## RESUM

Els aliments són susceptibles de ser transformats, ja siga per reaccions bioquímiques o per l'acció de microorganismes que modifiquen les seues característiques originals, provocant la seua deterioració. Per a perllongar la vida útil dels aliments s'utilitzen diferents tècniques de conservació, sent tradicionalment els tractaments tèrmics els més emprats. No obstant açò, aquestes tècniques que empenen altes temperatures, alteren les propietats sensorials i nutricionals de l'aliment.

Per açò, i al costat de la demanda dels consumidors d'aliments frescos i naturals, existeix un creixent interès per les tècniques de conservació no tèrmiques. L'objectiu d'aquestes noves tecnologies és assegurar la conservació d'aliments, mantenint el seu valor nutricional i propietats organolèptiques. L'ús de CO<sub>2</sub> en estat supercrític (SC-CO<sub>2</sub>) és una d'aquestes tecnologies. El SC-CO<sub>2</sub> ha sigut ressenyat per diferents autors en la inactivació d'enzims i microorganismes, alterant mínimament les propietats sensorials i nutricionals dels aliments.

Els microorganismes que la seua inactivació mitjançant SC-CO<sub>2</sub> ha sigut estudiada comprenen des de bacteris gram-negatives com la *Salmonella typhimurium*, *E. coli* o *Yersinia enterocolitica*, a bacteris gram-positives com *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* o llevats i fongs. En la majoria dels estudis s'ha observat que les cèl·lules gram-positives són més resistents que els bacteris gram-negatius pel major espessor de la seua paret cel·lular. El llevat *S. cerevisiae* presenta una paret similar als bacteris gram-positius, la qual cosa fa que presente una resistència enfront de tractaments de inactivació similar a la dels bacteris gram-positives.

Alguns autors han estudiat també l'efecte del SC-CO<sub>2</sub> en un sistema en continu, observant majors reduccions comparant amb sistemes de SC-CO<sub>2</sub> en discontinu.

D'altra banda, l'ús de fluids supercrítics assistits amb ultrasons de potència (HPU) permet una vigorosa agitació del medi, una ràpida dissolució del CO<sub>2</sub> en el medi i per tant un augment en la velocitat dels mecanismes de inactivació associats al CO<sub>2</sub> supercrític (caiguda ràpida del pH intracel·lular, increment en la transferència de massa, millora l'extracció dels components intracel·lulars vitals per a les cèl·lules). Aquesta tecnologia ha sigut desenvolupada en un sistema en discontinu, presentant importants reduccions en el temps de inactivació microbiana, comparat amb l'ús sol de fluids supercrítics. No obstant açò, en la indústria alimentària es precisa de sistemes en continu que permeten processar grans quantitats de producte. D'altra banda, no es

coneix a partir de la literatura l'efecte de la combinació de SC-CO<sub>2</sub> i HPU sobre la qualitat dels productes processats.

En aquest context, l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral va ser desenvolupar i aplicar un sistema d'inactivació de microorganismes en continu, emprant fluids supercrítics assistits amb ultrasons de potència (SC-CO<sub>2</sub>-HPU). S'avaluarà tant la capacitat d'inactivació microbiana de la tècnica com l'efecte dels tractaments sobre la qualitat dels aliments.

La primera etapa del projecte va consistir en l'adaptació del sistema de inactivació de microorganismes mitjançant fluids supercrítics (SC-CO<sub>2</sub>) i ultrasons (HPU) disponible en el grup ASPA (Grup d'Anàlisi i Processos Agroalimentaris, Universitat Politècnica de València) per a convertir el seu funcionament de discontinu o lots a continu. En aquesta etapa es va redissenyar l'equipament, tenint com a premisses l'aprofitament de la major quantitat possible de material disponible en la planta existent i mantenint les condicions de seguretat, que una instal·lació a pressió d'aquestes característiques requereix. Per al disseny es va tenir en compte la necessitat de perllongar el temps de residència del conjunt CO<sub>2</sub> supercrític/producte a tractar, en abordar-se un procés en continu, per a açò es va introduir una zona de manteniment (holding). La fase d'instal·lació va comprendre la redistribució de tots els elements per a adaptar-los als nous requeriments de l'equip. Posteriorment es va posar a punt l'equip fins a aconseguir que el dispositiu desenvolupat bombejara simultàniament i a condicions supercrítiques el CO<sub>2</sub> i un líquid.

La segona etapa va consistir a analitzar l'efecte de la pressió, temperatura i temps de residència sobre la inactivació de *S. cerevisiae* inoculat en suc de poma comercial, mitjançant el sistema de SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continu desenvolupat. Per a açò el suc va ser inoculat amb una concentració de cèl·lules de 10<sup>7</sup> UFC/mL i va ser tractat en l'equip de SC-CO<sub>2</sub> en continu, amb i sense HPU, per a avaluar l'efecte dels HPU. Les condicions emprades van ser: temps de residència de suc (3.06–9.2 min), temperatures (31–41°C) i pressions (100–300 bars). Les relacions d'inactivació es van ajustar a un model híbrid (booleà-real) per a estudiar l'efecte de les variables del procés. La màxima inactivació assolida pel sistema va ser de 7,8 cicles-log. El model híbrid va demostrar que l'ús d'ultrasons de potència té un efecte significatiu sobre la inactivació, sobretot per a temps de residència curts. Es va realitzar una optimització multiobjectiu amb el model híbrid, trobant-se que es podien obtenir 6.8 cicles-log d'inactivació després d'un temps de residència mínim (3.1 min) amb aplicació de HPU, mentre que en les mateixes condicions però sense HPU, la inactivació seria de 4.3

cicles logarítmics. Per tant, el sistema continu assistit per ultrasons va demostrar ser una tècnica amb un gran potencial per a la inactivació microbiana usant SC-CO<sub>2</sub> en condicions moderades de procés.

En la tercera etapa es va treballar amb suc de taronja, el qual és un dels suc processats més consumits a nivell mundial. No obstant açò, per a la seua conservació es requereix d'un tractament mitjançant calor, el qual provoca grans canvis organolèptics i nutricionals. En aquesta part del treball es va processar suc de taronja en l'equip de SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continu, amb la finalitat de comprovar la viabilitat del seu ús com a mètode de conservació, avaluant la possible reducció dels inconvenients atribuïts a la pasteurització tèrmica. Les condicions de procés emprades van ser: pressió (100 bar), temperatura (31, 36 i 41 °C) i temps de residència (3.06 min). El suc també va ser sotmès a un tractament tèrmic convencional (pasteurització) a efectes de comparació entre tractaments. Les anàlisis realitzades als suc, després dels tractaments van ser: microbiota (aerobis mesòfils totals, *E. coli* i *S.cerevisiae*), pH, °Brix, acidesa titulable, compostos fenòlics, capacitat antioxidant, núvol, índex browning, color i vitamina C. Els resultats experimentals van mostrar que el tractament mitjançant SC-CO<sub>2</sub>-HPU va aconseguir la completa inactivació de la població inicial d'*E.coli* i aerobis mesòfils totals, no obstant açò, la població de *S.cerevisiae* no es va inactivar totalment, encara que es van aconseguir reduccions de més del 99%. A més, després de comparar la tecnologia de SC-CO<sub>2</sub>-HPU amb el tractament convencional de pasteurització es van observar canvis inferiors al 1% en el pH i °Brix del suc, així com canvis menors del 5% en l'acidesa. D'altra banda, amb la tecnologia de SC-CO<sub>2</sub>-HPU es va obtenir un major índex pardejament (211%) i majors canvis en el color de suc. No obstant açò, es va aconseguir millorar el núvol del suc en un 173%, així com també es va obtenir una menor reducció de compostos fenòlics (6.5%) i àcid ascòrbic (5.5%) comparat amb el suc pasteuritzat tèrmicament. Així mateix, es va obtenir un augment de la capacitat antioxidant (12%) comparat amb el suc natural. Per tant, la tecnologia proposada permet reduir alguns dels efectes negatius en els paràmetres de qualitat del suc atribuïts a la tecnologia tèrmica convencional, per la qual cosa la seua aplicació a nivell industrial pot representar una alternativa a la mateixa.

La quarta etapa va consistir a avaluar l'efecte del temps de residència (3.06-4.6 min) a 100 bars i 31°C sobre les variables de qualitat i microbiota de suc de pinya tractat en l'equip de SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continu, a més d'analitzar la degradació de Vitamina C i l'evolució de la microbiota de suc de pinya fresc i tractat durant l'emmagatzematge a 4 °C. Els resultats van indicar que la inactivació de la microbiota

va ser completa i les diferències obtingudes en els atributs de qualitat (2,2% per a pH, 4,8% per a °Brix, 2% per a Vitamina C) van ser molt xicotetes. Durant l'emmagatzematge, els microorganismes no van ser capaços de recuperar-se i la disminució de la vitamina C podria limitar-se al 8.2% després de 4 setmanes. Així doncs, els resultats van demostrar que la tècnica SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continu podria ser una excel·lent alternativa per a la pasteurització en fred de suc de pinya.

Finalment, es pot concloure que la tècnica desenvolupada presenta un gran potencial com a mètode de conservació, ja que empra condicions de tractament suaus i temps de procés raonables per a la indústria alimentària, la qual cosa resultaria en un impacte molt xicotet sobre les propietats nutricionals i organolèptiques dels productes tractats. Així doncs, la tècnica ha resultat efectiva en diferents suc de fruites amb diferents característiques (poma, taronja i pinya). D'altra banda, seria convenient aprofundir en l'estudi de l'efecte de la tècnica desenvolupada sobre les propietats organolèptiques dels suc, mitjançant l'anàlisi sensorial de les mostres tractades.

# **1. INTRODUCCIÓN**

---



### 1. Introducción

Todos nuestros alimentos provienen de organismos de naturaleza biológica (plantas o animales), los cuales sufren transformaciones, 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.

El tratamiento térmico es un método eficaz de inactivación de microorganismos, gram positivos, gram negativos y ciertas esporas. Sin embargo, las temperaturas elevadas y los largos tiempos de tratamiento pueden tener efectos perjudiciales sobre la calidad del producto tratado, incluyendo la pérdida de nutrientes, los aromas de descomposición y el deterioro de los compuestos bioactivos presentes (Piyasena *et al.*, 2003). Por otro lado, los conservantes químicos (es decir, sales y ácidos orgánicos) pueden conducir a una baja aceptación por parte del consumidor, ya que pueden alterar las propiedades organolépticas de los alimentos y su ingestión se ha relacionado con efectos adversos a largo plazo para la salud (Rupasinghe & Yu, 2012)

En consecuencia, la industria de alimentos se encuentra en constante evolución en respuesta a un mercado que demanda cada día productos más seguros, de elevada calidad y económicamente accesibles (Cardello *et al.*, 2007; Ozuna, 2014). Por tal motivo, en los últimos años, este sector ha mostrado un interés creciente en la aplicación de “nuevas tecnologías” o “tecnologías emergentes” que sustituyan o complementen a los procesos convencionales de elaboración, transformación y conservación de alimentos (Knorr *et al.*, 2011).

La definición de "nuevas tecnologías" o "tecnologías emergentes" ha evolucionado en los últimos años. En un principio, estas tecnologías fueron definidas como procesos no térmicos, diseñados para desarrollar alimentos nutritivos, seguros y de elevada calidad. Actualmente, esta definición considera también la capacidad de estas tecnologías para modificar las propiedades funcionales del alimento y además contribuir a intensificar los procesos ya existentes (Roupas, 2008). En consecuencia, han surgido métodos alternativos de conservación de alimentos cuyas principales ventajas son la reducción del consumo de energía, la mejora de la seguridad del proceso, la conservación de las propiedades nutricionales y el aumento de la calidad global de los productos alimenticios (Ozuna, 2014). En la última década, un gran

número de investigaciones se han centrado en las tecnologías no térmicas en los procesos alimentarios, como una forma de contribuir a la reducción de microorganismos. Éstas abarcan desde tecnologías ampliamente comercializadas e industrializadas, como el procesamiento a alta presión (Campos & Cristianini, 2007, Patrignani *et al.*, 2009), a tecnologías que todavía se están probando a escala de laboratorio, como el uso de ultrasonidos de potencia (Bermudez & Barbosa, 2012), campos eléctricos pulsados (Aronsson *et al.*, 2001, Aronsson *et al.*, 2005), dióxido de carbono supercrítico (Ortuño *et al.*, 2013; Paniagua-Martínez *et al.*, 2016), luz ultravioleta (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2009; Kaya & Unluturk, 2016) o luz pulsada (Ferrario *et al.*, 2013, 2015), entre otras.

Por otro lado, las tecnologías de barrera tienen como objetivo desarrollar procesos suaves basados en interacciones sinérgicas entre diferentes tratamientos de conservación (Leistner, 1992; Ross *et al.*, 2003). En este sentido, la combinación de tecnologías no térmicas con técnicas físicas y químicas tradicionales puede producir efectos antimicrobianos sinérgicos en los sistemas alimentarios (Gómez *et al.*, 2011). Según Ferrario *et al.* (2015), la selección de las barreras no térmicas viene determinada por las características de las células microbianas y los medios en los que se encuentran éstas (actividad del agua, temperatura, pH y composición química).

Dado que los fluidos supercríticos pueden resultar de interés para el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación y son la técnica empleada en la presente Tesis Doctoral, es necesario, para una mejor comprensión de los fenómenos que ocurren, la descripción de sus características principales.

### 1.1 Generalidades de los fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (SC) es un fluido en condiciones termodinámicas de presión y temperatura por encima del punto crítico (McHugh *et al.*, 1994), siendo éste el punto establecido por una temperatura crítica ( $T_c$ ) y una presión crítica ( $P_c$ ). En este estado la fase líquida y gaseosa son indistinguibles.

Si se observa el diagrama de fases de un compuesto puro (Fig. 1.1.) en él aparecen tres regiones diferenciadas que corresponden a tres de los estados de agregación: sólido, líquido y gaseoso. Estas tres regiones están separadas por líneas representativas de los equilibrios entre las fases. El cambio entre las fases se consigue variando la presión y/o la temperatura con adición o extracción de energía.

En el diagrama de fases aparecen también dos puntos singulares: uno, situado donde convergen las tres curvas, es el punto triple y representa el estado de equilibrio en el que coexisten las fases sólida, líquida y gaseosa y el otro, ubicado al final de la curva de vaporización que representa las condiciones de presión y temperatura en las que dejan de existir como tales las fases líquida y gaseosa, para dar lugar a otra nueva región. Este punto se denomina punto crítico y la región que aparece encima se conoce con el nombre de región supercrítica.

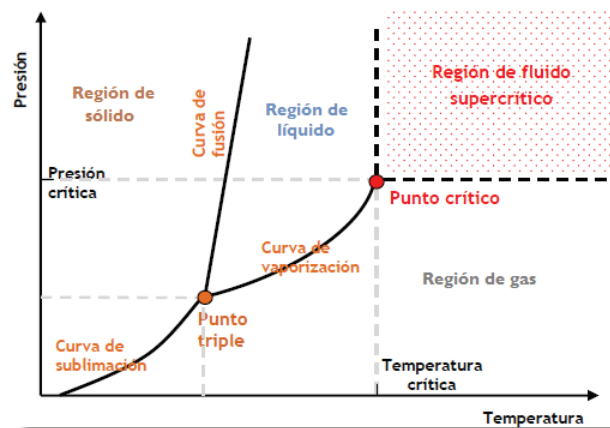


Fig. 1.1. Diagrama de fases de un compuesto puro.

Tanto el punto triple como el punto crítico son característicos de cada sustancia.

El punto crítico posee diversas propiedades muy características:

- No existe interfase gas-líquido..
- La entalpía de vaporización es cero.

Puesto que los efectos dependen de las características físicas del fluido resulta de interés examinar las mismas en vistas a su posible aplicación en procesos alimentarios.

### 1.2 Propiedades de los fluidos supercríticos

En la Tabla 1.1. se resumen las propiedades básicas y de mayor utilidad de los fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico posee propiedades fisicoquímicas intermedias entre los líquidos y gases, lo que mejora sus propiedades, como solvente tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido (Velasco, 2007).

Su densidad similar a la de los líquidos le confiere características de solvente; la difusividad y viscosidad son similares a los valores de los gases, lo que le provee un gran poder de penetración dentro de una matriz sólida porosa. Estas propiedades (densidad, difusividad y viscosidad) originan un incremento en la velocidad de transferencia de masa del soluto, dentro de los fluidos supercríticos (Brunner, 2005).

La mayoría de los fluidos supercríticos empleados son gases en condiciones ambientales, su eliminación después de la extracción se realiza simplemente reduciendo la presión y/o disminuyendo la temperatura. De esta manera, no se producen pérdidas de solutos y no se contamina la muestra por el uso de solventes orgánicos. Como el poder disolvente es directamente proporcional a la densidad y los fluidos supercríticos son compresibles, especialmente cerca del punto crítico, los solutos exhiben variaciones muy pronunciadas en su solubilidad según las condiciones de extracción (Del Valle y Aguilera, 1999). Este tipo de fluidos presentan una gran capacidad de extracción, debido a que la acumulación de moléculas alrededor del soluto es importante cuando las densidades son lo suficientemente bajas como para que predominen los efectos de atracción molecular, ya que las moléculas no sufren exclusión debido a la existencia de mucho espacio libre entre ellas (Fernández y Fernández, 1997).

**Tabla 1.1.** Comparación de propiedades de gases, líquidos y fluidos supercríticos.

	Densidad ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ )	Difusividad ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	Viscosidad ( $\text{Pa} \cdot \text{s}$ )
<b>Gases</b>	0.6 - 1	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$
<b>Fluidos Supercríticos</b>	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$
<b>Líquidos</b>	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$

(Fernández y Fernández, 1997).

La densidad del fluido supercrítico es de 100 a 1000 veces mayor que la de un gas, y comparable a la de un líquido. En consecuencia, las interacciones moleculares pueden ser fuertes, permitiendo acortar las distancias intermoleculares (Knowles *et al.*, 1988). Como resultado, las propiedades de solvatación son similares a las de los líquidos, pero con viscosidades significativamente más bajas y coeficientes de difusión más altos. La densidad cambia al realizar pequeñas variaciones en la presión y temperatura (Raventós *et al.*, 2002). Estas propiedades pueden ser explotadas para una gran variedad de propósitos, incluyendo la producción de nuevos materiales, la destrucción de residuos peligrosos y el reemplazo de solventes tóxicos para los procesos de limpieza industrial (Fernández y Fernández, 1997).

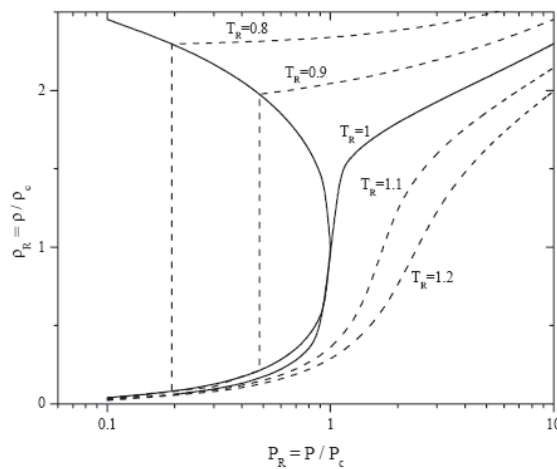
Al ser de 10 a 100 veces más bajos los valores de viscosidad y de 10 a 100 veces más altos los coeficientes de difusión respecto a los de los líquidos existe una mayor velocidad de transferencia de masa de los solutos de la matriz al seno del fluido (Schneider, 1978). Así, los fluidos supercríticos son únicos ya que tienen el poder de solvatación de los líquidos y las características de transporte de los gases. (Abaroudi, 2001).

1.2.1 Densidad de los fluidos supercríticos

La densidad de los fluidos supercríticos depende de la presión y de la temperatura. La variación de la densidad con la presión a temperatura constante es típicamente no lineal. Este fenómeno se ilustra en la Fig 1.3. donde se muestra un diagrama de fases presión-densidad en escalas reducidas. A temperaturas inferiores al valor crítico existen dos fases.

Las líneas continuas representan las isothermas; las intersecciones con la curva principal indican la densidad del gas y del líquido en equilibrio. A una temperatura reducida igual o mayor a la unidad se observan dos rasgos importantes. Primero, la densidad reducida ( $\rho_R$ ) se incrementa continuamente cuando se incrementa la presión. Segundo, cerca de la temperatura crítica, la densidad del fluido supercrítico puede cambiar dramáticamente con pequeños cambios en la presión (Taylor, 1996).

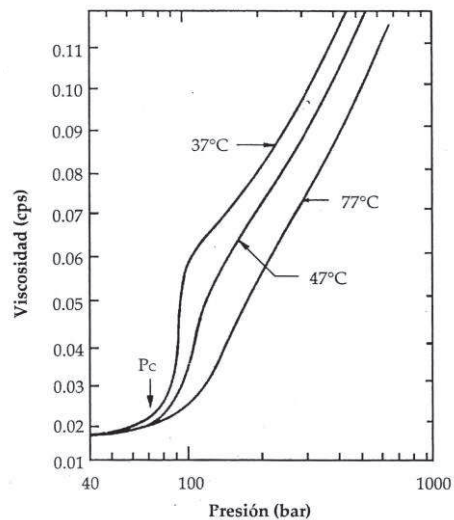
La densidad en la región supercrítica se incrementa cuando se incrementa la presión a temperatura constante y decrece cuando se incrementa la temperatura a presión constante (Mukhopadyay, 2000).



**Fig. 1.2.** Variación de la densidad reducida del CO<sub>2</sub> con la presión reducida en los alrededores del punto crítico. (Palencia, 2007).

1.2.2 Viscosidad de los fluidos supercríticos

La viscosidad de los fluidos (gas, líquido o fluido supercrítico) depende de la temperatura. La presión tiene un pequeño efecto sobre la viscosidad de los líquidos, pero presenta un gran efecto en los fluidos supercríticos, donde la viscosidad es de hasta dos órdenes de magnitud menor que la de los solventes líquidos. La Fig. 1.4. muestra la variación de la viscosidad del CO<sub>2</sub> en función de la presión a diferentes temperaturas. A presiones mayores que la presión crítica, la viscosidad es fuertemente dependiente de la temperatura y la presión. Lo que muestra que es posible obtener cambios considerables en la viscosidad de los fluidos supercríticos mediante pequeñas variaciones en las condiciones de operación del sistema (McHugh *et al.*, 1994).



**Fig 1.3.** Comportamiento de la viscosidad del CO<sub>2</sub> a diferentes temperaturas, en función de la presión. (Palencia, 2007).

1.2.3 Difusividad de los fluidos supercríticos

Las difusividades de los fluidos supercríticos se encuentran entre los valores de difusividad de los líquidos y los gases. Consecuentemente, al utilizar un fluido supercrítico se pueden realizar extracciones más eficientes, sobre todo en lechos fijos, que empleando solventes líquidos convencionales, al ser menores tanto la caída de la presión como la resistencia a la transferencia de materia (Del Valle & Aguilera, 1999).

Las difusividades de los fluidos supercríticos, por encima del punto crítico, son dependientes de la temperatura y la presión; aumentando la difusividad al disminuir la presión y al aumentar la temperatura (Palencia, 2007).

### 1.2.4 Solubilidad de los fluidos supercríticos

En condiciones ambientales (298.15 K y 1.01325 bar) la solubilidad de un soluto, líquido o sólido, en un gas, está relacionada directamente con la presión del vapor del soluto y es generalmente despreciable. En un fluido supercrítico, las solubilidades del soluto se encuentran por encima de diez órdenes de magnitud de los predichos por la ley de los gases ideales (Tomasko *et al.*, 1993). Las diferencias de solubilidad de los distintos compuestos en los fluidos supercríticos se deben a las características de los solutos, tal como su presión de vapor e interacciones particulares que ocurren entre el soluto y el solvente. Como resultado de esto, moléculas muy parecidas tienen solubilidades diferentes. A cualquier temperatura y presión se puede separar un compuesto de otro, o de otros, aprovechando sus diferentes solubilidades (Espinosa, 2001).

### 1.3 Empleo del CO<sub>2</sub> supercrítico como técnica no térmica de inactivación microbiana

El procesamiento con dióxido de carbono supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) es un proceso no térmico capaz de inactivar microorganismos. En el estado supercrítico las propiedades físicas del CO<sub>2</sub> son muy diferentes a las de otros estados: aumenta su densidad, disminuye su viscosidad y aumenta su difusividad. Estas características le dan excelente poder de disolución y penetración, mejorando la entrada a través de las paredes celulares y membranas. Para el uso como esterilizante, el CO<sub>2</sub> sigue siendo el gas preferido debido a que no es tóxico, no tiene requerimientos especiales de manejo y ventilación, es químicamente inerte (no reacciona con los polímeros), tiene una tensión superficial extremadamente baja o nula (penetra rápidamente a través de estructuras complejas y materiales porosos), es no inflamable, es fisiológicamente seguro, está fácilmente disponible, puede ser fácilmente eliminado por simple despresurización y expulsión de gases, es fácilmente controlable, es un ingrediente de alimentos y bebidas (productos carbonatados), no deja residuos en el producto tratado, es accesible y es barato. El SC-CO<sub>2</sub> es "generalmente considerado como seguro" (GRAS), lo que significa que puede ser utilizado en productos alimenticios. Su punto crítico (7,38 MPa y 31,1 °C) es moderadamente bajo, por lo que los productos termolábiles orgánicos pueden procesarse sin riesgo de desnaturalización o



descomposición térmica. El número de aplicaciones de CO<sub>2</sub> supercrítico para inactivar microorganismos ha aumentado significativamente durante los últimos años debido principalmente a su eficacia en el tratamiento de los diferentes microorganismos (bacterias, hongos, virus). El SC-CO<sub>2</sub> permite reducir significativamente el número de células vegetativas en alimentos líquidos, en el rango de 2-8 ciclos log/mL de alimento líquido (Erkmen, 2002).

### 1.3.1 Efecto del CO<sub>2</sub> supercrítico sobre la inactivación de células bacterianas, formas vegetativas de hongos y levaduras

Las bacterias generalmente se clasifican como Gram-positivas y Gram-negativas, de acuerdo con sus respuestas a la reacción de tinción de Gram. Las diferencias en la respuesta provienen del contenido diferente de peptidoglicano de las paredes celulares. Las paredes de las células gram-positivas tienen capas de peptidoglicano muy gruesas (90% de la pared celular), que hacen que las paredes celulares sean fuertes y resistentes. Las gram negativas tienen células complejas con estructura de pared celular y peptidoglicano mucho más delgado (10% de la pared celular). Por lo tanto, las células gram-positivas son generalmente más resistentes a tratamientos de inactivación.

Kamihira *et al.* (1987) describieron una reducción de 4-6 log en el número de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* en un proceso de inactivación mediante SC-CO<sub>2</sub> en sistema discontinuo durante 2 h a 20 MPa y 35 °C en una suspensión al 0.85% de NaCl. En un sistema semicontinuo, las células gram-positivas de *Bacillus subtilis* PBS fueron completamente inactivadas (7 ciclos-log) después de 2,5 minutos de exposición a CO<sub>2</sub> supercrítico (7,4 MPa y 38° C) (Spilimbergo *et al.*, 2002), mientras que para inactivar el mismo número de Gram-negativas *Serratia marcescens* fueron necesarios 30 min (Garcia-Gonzalez *et al.* 2007). Erkmen (1997, 2000, 2000a), reportó una serie de estudios sobre el efecto del CO<sub>2</sub> supercrítico en la inactivación de microorganismos en un sistema discontinuo, empleando diferentes materiales como medio de suspensión, algunos fueron microorganismos patógenos y psicrófilos, bien conocidos por su capacidad de crecer en los alimentos y causar deterioro y enfermedades transmitidas por los alimentos. En estos estudios, se observaron dos etapas en las curvas de supervivencia. La etapa temprana se caracterizó por una lenta tasa de reducción en el número de microorganismos, que luego se redujo rápidamente en una etapa posterior.

La tasa de inactivación, se ve aumentada con la temperatura, la presión y el tiempo de exposición, donde la temperatura y la presión tienden a actuar sinérgicamente (Erkmen, 2002; Lin *et al.*, 1992). La tasa de inactivación también depende del número inicial de células, el tipo de especies bacterianas y el tipo de medio donde están suspendidos. Por otra parte, los compuestos orgánicos (como los carbohidratos y las grasas entre otros) presentes en los medios pueden aumentar la resistencia de las bacterias al tratamiento mediante SC-CO<sub>2</sub> (Balaban & Duong, 2014; Benedito *et al.*, 2015). El pH inicial del medio de tratamiento también puede afectar a la tasa de inactivación microbiana. Un pH bajo facilita la penetración del ácido carbónico y otros ácidos carboxílicos (Lindsay, 1976) a través de la membrana celular y, por lo tanto, se consigue una mayor inactivación.

En este sentido, los efectos inactivantes del CO<sub>2</sub> en estado supercrítico sobre *S. cerevisiae* se incrementaron drásticamente con el aumento de la presión, la temperatura y la duración del tratamiento (Erkmen 2002). La viabilidad de *Kluyveromyces fragilis*, *S. cerevisiae* y *Candida utilis* bajo tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> dependió de la temperatura y presión del CO<sub>2</sub>. Por otro lado, la inactivación de las células de levadura se debió a la eliminación de componentes vitales de la membrana celular, no observándose ruptura de la pared celular (Isenschmid *et al.*, 1995). Parton *et al.* (2003) observaron una reducción de 4 ciclos logarítmicos de *S. cerevisiae* después de 40 minutos de proceso mediante SC-CO<sub>2</sub> en un sistema discontinuo (a 9 MPa y 38 °C), mientras que fueron necesarios más de 60 min para lograr la inactivación de 7 ciclos logarítmicos de células de *S. cerevisiae* en las mismas condiciones.

El efecto del número inicial de células microbianas sobre su inactivación mediante SC-CO<sub>2</sub> puede ser causado por los componentes celulares (proteínas, lípidos, carbohidratos, etc.) que son liberados de células lisadas que pueden a su vez, proteger a otras células microbianas de los efectos de SC-CO<sub>2</sub>. Por lo tanto, las células microbianas están más expuestas al CO<sub>2</sub> presurizado cuando hay un número microbiano inicial bajo y por lo tanto son más sensibles a la inactivación.

La inactivación microbiana puede depender del tipo de sistema, lo que determina la concentración de CO<sub>2</sub> introducido en la fase acuosa de la suspensión. En este sentido, los sistemas (semi)-continuos requieren tiempos de inactivación mucho más cortos comparados con los discontinuos (lotes), debido a la mejora en la transferencia de materia del CO<sub>2</sub> producida por la agitación relacionada con el flujo de CO<sub>2</sub>. Esto

permite tanto una rápida saturación del medio por CO<sub>2</sub> como la aceleración de los mecanismos de inactivación (Damar & Balaban, 2006).

Ishikawa *et al.* (1995) obtuvieron una reducción logarítmica cuatro veces mayor de *S. cerevisiae* utilizando un sistema de filtro de microburbujas para el proceso de SC-CO<sub>2</sub> en comparación con un sistema discontinuo. La mayor eficiencia en la inactivación de los microorganismos en este sistema semicontinuo se debió al aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> en el reactor de microburbujas. Del mismo modo, Spilimbergo & Bertucco (2003) demostraron que un sistema semicontinuo es más eficiente que un sistema discontinuo. A 8,0 MPa y temperaturas de 38-40 °C, fue necesario un tiempo de tratamiento de 40-60 min para una inactivación completa de *S. cerevisiae* en un sistema discontinuo, mientras que 7.5 min fueron suficientes para inactivar completamente la levadura, usando un sistema semi-continuo. Shimoda *et al.* (1998) compararon un sistema continuo y un sistema discontinuo para aplicar CO<sub>2</sub> presurizado sobre *S. cerevisiae*. El sistema continuo inactivó eficazmente el microorganismo en menos tiempo (15 min) en comparación con el sistema en discontinuo que requirió de 30 min.

#### 1.4 Mecanismos de inactivación microbiana mediante el empleo de CO<sub>2</sub> supercrítico

Los mecanismos de inactivación asociados al proceso de inactivación con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico están basados en teorías detalladas por Daniels *et al.* (1985) y han sido aceptadas por autores que han centrado sus investigaciones en este campo de estudio (Damar & Balaban, 2006; García-González, 2010). Actualmente, estos mecanismos de inactivación han sido reforzados y descritos con mayor claridad gracias a estudios llevados a cabo empleando técnicas más avanzadas como la microscopía electrónica de barrido (SEM; Dillow *et al.*, 1999; Spilimbergo *et al.*, 2003a) y microscopía electrónica de transmisión (TEM; Oulé *et al.*, 2006; Garcia-González *et al.*, 2010; Ortuño *et al.*, 2014), en los cuales se ha evaluado el estado de las células antes y después del tratamiento.

Según la literatura, existen siete etapas principales que fundamentan los mecanismos de inactivación de microorganismos mediante el empleo de CO<sub>2</sub> en estado supercrítico: (1) la disolución del CO<sub>2</sub> presurizado en la fase líquida donde se encuentran las células suspendidas; (2) difusión del CO<sub>2</sub> y modificación de la membrana celular; (3) penetración del CO<sub>2</sub> en el interior de la célula y disminución del pH intracelular; (4) inhibición del metabolismo celular debido a la inactivación de

enzimas claves; (5) inhibición directa del metabolismo celular en respuesta a la presencia del  $\text{CO}_2$  y formación de  $\text{HCO}_3^-$ ; (6) desequilibrio de los electrolitos intracelulares y (7) extracción de los componentes intracelulares y ruptura celular (Damar & Balaban, 2006; García-González *et al.*, 2007; 2010).

### 1.4.1 Disolución del $\text{CO}_2$ presurizado en la fase líquida

En esta etapa el ácido carbónico  $\text{H}_2\text{CO}_3$  se forma debido a la disociación del  $\text{CO}_2$  en la fase líquida de los alimentos. En el equilibrio el  $\text{H}_2\text{CO}_3$  se disocia en una segunda reacción reversible liberando los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  provocando acidificación del medio (pH extracelular) (Erkmen, 2012). La acidificación del medio extracelular puede favorecer al efecto antimicrobiano del  $\text{CO}_2$  presurizado ya que la célula pretende encontrar el equilibrio quimiostático y para ello sintetiza componentes básicos que transporta al exterior. Sin embargo, la reducción del pH externo no es el efecto letal del SC- $\text{CO}_2$ , ya que no se ha obtenido un efecto similar en medios acidificados (Kincal *et al.*, 2005). Se ha sugerido por tanto que la reducción de pH contribuye a una modificación de la capa fosfolipídica de la membrana celular, incrementándose la permeabilidad al  $\text{CO}_2$  y facilitando la penetración del  $\text{CO}_2$  en el interior celular.

### 1.4.2 Difusión del $\text{CO}_2$ y modificación de la membrana celular

En esta etapa, el  $\text{CO}_2$  se difunde al interior de la membrana celular, acumulándose en la fase lipídica de la membrana, lo que podría modificar estructural y funcionalmente la membrana debido, principalmente, a un desorden de la cadena hidrocarbonada del lípido y la ruptura de las interacciones lípido-proteicas que provocan un aumento de la fluidez y permeabilización de la membrana celular (Damar & Balaban, 2006; García- González *et al.*, 2007). La acumulación de  $\text{CO}_2$  en el interior de la célula, provoca la extracción de componentes intracelulares, alterando su sistema biológico y promoviendo la inactivación (García-González *et al.*, 2010; Ortuño *et al.* 2014).

### 1.4.3 Penetración del $\text{CO}_2$ en el interior de la célula y disminución del pH intracelular

En esta etapa el  $\text{CO}_2$  penetra a través de la membrana, acumulándose en el interior de las células, aumentando la concentración de  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$ , que se disociarán desestabilizando el equilibrio interno de las células, por lo que la inactivación de microorganismos debido al efecto del pH está asociada a una

desnaturalización de las enzimas celulares por una disminución del pH interno y a un colapso del sistema celular amortiguador del pH (Erkmen, 2012)

#### 1.4.4 Inhibición del metabolismo celular debido a la inactivación de enzimas

Dada la naturaleza proteica de las enzimas, una acidificación conduce a su desnaturalización, por lo que una caída del pH en el citoplasma podría causar la inhibición o inactivación de enzimas clave y esenciales para procesos metabólicos y reguladores como la glicólisis, transporte de aminoácidos e iones (García-González *et al.*, 2007; 2010)

#### 1.4.5 Inhibición directa del metabolismo celular en respuesta a la presencia del CO<sub>2</sub> y formación de HCO<sup>3-</sup>

Durante los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub> disuelto y la concentración de HCO<sup>3-</sup> formado, pueden actuar como sustrato y producto respectivamente, en reacciones de carboxilación y descarboxilación, causando efectos perjudiciales en el metabolismo de la célula (García-González *et al.*, 2007; 2010).

#### 1.4.6 Desequilibrio de los electrolitos intracelulares

El daño letal provocado por el tratamiento mediante SC-CO<sub>2</sub> supercrítico en los sistemas biológicos ocurre principalmente por la acumulación del CO<sub>2</sub> en el interior del citoplasma de la célula bacteriana, provocando la precipitación de iones, pérdida del equilibrio celular y desorden del balance osmótico.

#### 1.4.7 Extracción de los componentes intracelulares y ruptura celular

El incremento de la permeabilidad de las membranas permite la difusión del CO<sub>2</sub> al interior celular, extrayendo componentes intracelulares como fosfolípidos y compuestos hidrofóbicos, proteínas y ácidos grasos; produciendo un desequilibrio del sistema biológico y provocando la lisis celular (García-González *et al.*, 2007).

### 1.5 Combinación de SC-CO<sub>2</sub> con tecnologías no térmicas de conservación

A pesar que el uso de CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico representa un prometedor método de procesamiento no térmico, en algunos casos se requieren altas presiones, altas temperaturas pero sobre todo largos tiempos de tratamiento para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos, especialmente en sistemas por lotes. En estos sistemas, el acoplamiento con otras tecnologías podría ser necesario para

obtener la letalidad requerida en tiempos de procesamiento más cortos e intensidades de tratamiento más bajas.

Se han estudiado combinaciones de sistemas de SC-CO<sub>2</sub> en discontinuo con otras tecnologías no térmicas, tales como PEF (Pulsos Eléctricos) y HPU (Ultrasonidos de Potencia), para mejorar la inactivación de microorganismos en medios líquidos.

Pataro *et al.* (2010) aplicaron el tratamiento secuencial de PEF (intensidad de campo eléctrico de 6, 9, 12 kV / cm y 10, 20 y 40 J / mL) y SC-CO<sub>2</sub> (8, 11 y 14 MPa, 35 °C durante 3-30 min) sobre *S. Cerevisiae* y lo compararon con muestras tratadas con PEF o SC-CO<sub>2</sub> únicamente. Para el tratamiento de PEF sin el empleo de SC-CO<sub>2</sub>, la inactivación máxima se alcanzó a 12 kV/cm y 20 J / mL con una reducción de 0,35 ciclos logarítmicos, mientras que para SC-CO<sub>2</sub> sin PEF fue a 8 MPa, 35°C y 3 min alcanzando una reducción de 3,13 ciclos logarítmicos. Aumentar la presión y el tiempo de proceso no mejoró la máxima reducción de células de levadura. Sin embargo, el tratamiento secuencial de PEF y SC-CO<sub>2</sub> (8 MPa, 25 ° C, 5 min) resultó en la inactivación total, independientemente del nivel de campo eléctrico del tratamiento de PEF. En este caso, la entrada de energía del tratamiento de PEF aumentó significativamente el efecto de inactivación del SC-CO<sub>2</sub> sobre *S.cerevisiae*.

El uso de ultrasonidos de potencia en combinación con CO<sub>2</sub> supercrítico será abordado con detalle en el apartado 1.7.4.

### 1.6 Generalidades de los ultrasonidos

Los ultrasonidos son ondas elásticas de frecuencia superior a las audibles por el ser humano (20 kHz), por su naturaleza estas ondas necesitan un medio para propagarse (Soria & Villamiel, 2010). La fuente de producción de ultrasonidos suele ser un cuerpo vibrante. Así, el movimiento de vibración de dicho cuerpo se comunica a las partículas del medio que le rodean, las cuales comienzan a oscilar, comunicando la energía de forma también oscilante a las partículas vecinas (Ozuna, 2015).

Las ondas acústicas, como cualquier otro tipo de onda, se caracterizan por una serie de parámetros:

**Frecuencia:** La frecuencia de una onda se define como el número de vibraciones o ciclos completados por la onda en una unidad de tiempo. Al inverso de la frecuencia se le denomina periodo y se define como el tiempo necesario para que cada onda realice un ciclo (Ozuna, 2014). En función de la frecuencia, las ondas acústicas se dividen en cinco grupos: infrasonido (<20 Hz), espectro audible (de 20 Hz a 18 kHz), ultrasonidos de baja frecuencia (de 18-100 kHz), ultrasonidos de alta frecuencia (de 100 kHz– 1 MHz) y los ultrasonidos de diagnóstico (>1 MHz) (Chemat *et al.*, 2011).

**La velocidad acústica:** se define como la velocidad de propagación de la onda: cuando las partículas se mueven en dirección de propagación de la onda se llaman ondas longitudinales, si el movimiento es perpendicular, transversales, y cuando el movimiento de las partículas se lleva a cabo por la superficie, se denominan ondas de Rayleigh (Corona, 2013).

**Longitud de onda:** La longitud de onda ( $\lambda$ ) se define como la distancia entre dos planos en los que las partículas se encuentran en el mismo estado de vibración.

**Amplitud:** La amplitud de la onda es el máximo desplazamiento de la partícula desde la posición de equilibrio.

**Presión acústica:** La presión acústica es la presión existente en las diversas zonas del medio. Esta presión será mayor que la zona media en las zonas de contracción de partículas y menor en las zonas dilatadas, por lo que la presión acústica es alterna. La desviación máxima en relación a la media se denomina amplitud de la presión acústica y está relacionada con la amplitud de oscilación de la onda.

**Intensidad acústica:** La intensidad de una onda acústica ( $I$ ) se define como la energía media transmitida a través de la unidad de área perpendicular a la dirección de propagación de la onda por unidad de tiempo. La intensidad acústica es proporcional al cuadrado de la presión acústica máxima.

**Densidad de energía:** Al propagarse una onda, se transmite energía que puede ser disipada en forma de calor debido al trabajo realizado al desplazar las partículas en un medio sujeto a fuerzas contrarias al desplazamiento de las mismas. La densidad de energía se mide en unidades de  $J/m^3$  (Ozuna *et al.*, 2015).

**Potencia acústica:** La potencia acústica es la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo. Se puede calcular a partir de la intensidad acústica y del área de la superficie radiante.

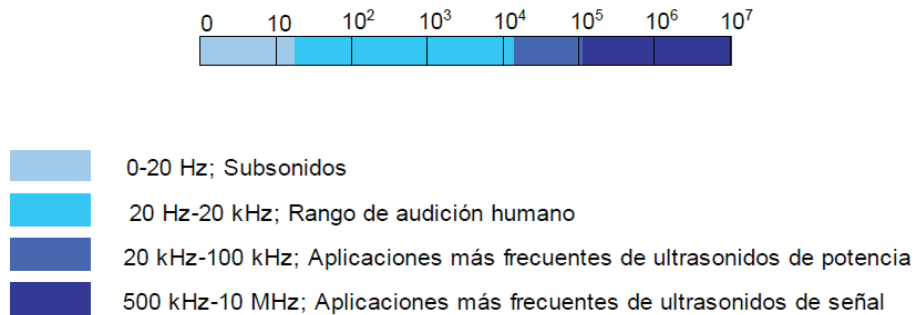
**Impedancia acústica:** La impedancia acústica ( $Z$ ) se define como la relación entre la presión acústica y la velocidad de vibración de la partícula. Se puede calcular a partir de la velocidad acústica ( $v$ ) y la densidad del medio. Es un parámetro muy importante para determinar la proporción de energía que se refleja y la que se transmite en la interfase cuando una onda acústica cambia de medio (Ozuna, 2014). Esta característica presenta una gran importancia en las aplicaciones de los ultrasonidos. Si la proporción de energía reflejada es mayor que la transmitida, los efectos de los ultrasonidos podrían ser más intensos en la interfase. Si por el contrario, la energía transmitida es mayor, se incrementan los efectos de los ultrasonidos en el interior del segundo medio (García-Pérez, 2007).

**Atenuación:** En la propagación de la onda ultrasónica en un medio la intensidad de la onda disminuye al aumentar la distancia a la fuente que la produce. Este fenómeno es conocido como atenuación. La atenuación puede ser consecuencia de la reflexión, la dispersión o la difracción de la onda durante su propagación, o como consecuencia de la conversión de parte de la energía cinética de la onda en calor.

Los ultrasonidos se pueden clasificar según sus aplicaciones industriales (Fig. 1.4), a partir de su frecuencia y su intensidad (McClements, 1997). Por un lado, se encuentran los ultrasonidos de potencia (HPU), también conocidos como de alta intensidad, con frecuencias comprendidas entre 20 y 100 kHz e intensidades superiores a  $1 W/cm^2$ . Los ultrasonidos de potencia pueden producir cambios en los materiales o afectar a los procesos. Por el otro lado, se encuentran los ultrasonidos de señal, también conocidos como de baja potencia o intensidad o de alta frecuencia. Se caracterizan por utilizarse en frecuencias que oscilan entre los 100 kHz y los 20 MHz e intensidades inferiores a  $1 W/cm^2$ . Los ultrasonidos de señal no afectan a los productos ni a los procesos ya que la energía involucrada es débil. Se utilizan para el



control de procesos o el análisis no destructivo de materiales. Generalmente, los ultrasonidos de potencia se aplican en forma continua mientras que los de señal se aplican en pulsos (Carcel, 2003).



**Fig. 1.4.** Clasificación de las ondas elásticas en función de la frecuencia

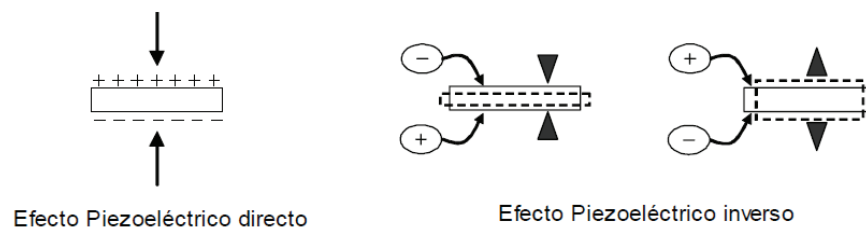
### 1.6.1 Sistemas de generación de ultrasonidos de potencia

En general, la producción de HPU consiste en la conversión de cualquier otro tipo de energía en energía acústica. Los sistemas de ultrasonidos constan de tres partes fundamentales: generador, transductor y emisor. El generador es el encargado de transformar la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada; el transductor convierte la señal eléctrica de alta frecuencia en vibraciones mecánicas; y el emisor irradia la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar (Cárcel, 2003).

Los transductores se pueden clasificar en 3 grandes grupos en función de la forma de ser excitados para generar las ondas ultrasónicas: los transductores operados mediante fluidos, los transductores magnetostrictivos y los transductores piezoeléctricos. El presente trabajo emplea el uso de transductores piezoeléctricos por lo que se describirá este tipo.

Un transductor piezoeléctrico (Fig. 1.5) se basa en la generación de oscilaciones eléctricas, de una frecuencia determinada, que se aplican sobre las caras de un cristal, este se contrae o se expande en función de la polaridad de las cargas eléctricas. Así, el paso de una corriente eléctrica alterna de elevada frecuencia, provocará la vibración del material, lo que dará lugar a la generación de una onda ultrasónica. Los cristales piezoeléctricos que pueden presentar dicho efecto son el cuarzo o bien, materiales cerámicos ferroeléctricos policristalinos, llamados comúnmente, cerámicas

piezoeléctricas (García-Pérez, 2007). Dichas cerámicas están acopladas a elementos metálicos como el titanio que las aísla de un sobrecalentamiento. Una de las disposiciones más usadas en la aplicación de ultrasonidos es el sistema tipo “sándwich”. El cual consiste en montar un par de cerámicas conectadas con las polarizaciones en sentido opuesto, a las que se les suele acoplar dos cilindros metálicos que comprimen la estructura mediante un tornillo colocado en forma axial. De esta manera, la onda transmitida por cada transductor está relacionada con la longitud de los cilindros metálicos. Así, los transductores son conectados a sistemas vibrantes cuya función consiste en transmitir la vibración del transductor al medio y finalmente, es el cilindro frontal quien dirige la onda ultrasónica generada al medio de tratamiento (Ortuño, 2014).



**Fig. 1.5.** Efecto piezoeléctrico

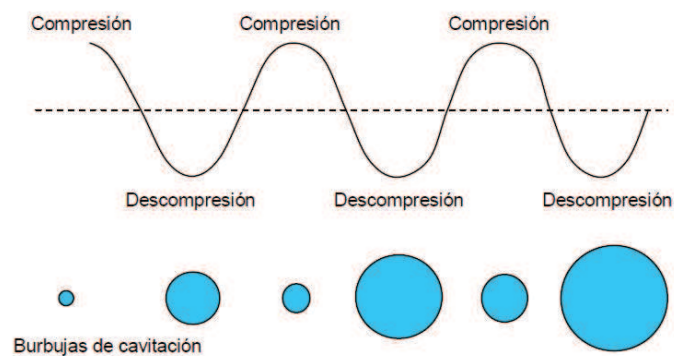
### 1.6.2 Efectos de los ultrasonidos de potencia

Los HPU alteran y modifican el medio en el que son aplicados. Los efectos atribuidos a los ultrasonidos pueden ser muy diferentes en función del medio físico en el que estos se transmiten. Se emplean en campos tan dispares como la limpieza, el secado, la filtración, la inactivación de microorganismos y enzimas, la extracción, el corte de alimentos, etc. La amplia variedad de efectos asociados a los HPU puede explicarse mediante varios mecanismos asociados.

Los principales efectos son:

**La cavitación:** En medios líquidos, los HPU generan ciclos de compresión y rarefacción, de manera que cuando la energía ultrasónica alcanza un umbral, durante el ciclo de rarefacción se pueden superar las fuerzas de atracción que mantienen unidas a las moléculas y, a partir de núcleos de gas existentes, podrían aparecer burbujas de cavitación (Soria y Villamiel, 2010). Puede ser producida de dos formas: transitoria y estable (Mason & Lorimer, 2002) (Figura 1.6). En la primera de ellas, las burbujas generadas por la cavitación se llenan de gas o vapor debido a oscilaciones

irregulares, aumentando su tamaño e implosionando, provocando elevaciones de presión ( $\sim 1000$  bar) y temperatura ( $>4000$  °C); en consecuencia, se pueden producir fuerzas de corte y **turbulencia** en la zona de cavitación. Este fenómeno podría favorecer el efecto de inactivación enzimática y la desintegración celular (Knorr *et al.*, 2004). La cavitación estable se refiere a la oscilación de las burbujas en un comportamiento regular durante los ciclos acústicos, pudiendo mantener un aumento y disminución de su tamaño hasta alcanzar dicha estabilidad y favoreciendo la formación de **microcorrientes** de alta intensidad en el líquido circundante. Esta micro-agitación puede estresar las especies biológicas favoreciendo la inactivación de microorganismos presentes en el medio (Chemat *et al.*, 2011). La intensidad de la cavitación y sus efectos dependerán de las características del medio, como son su viscosidad, las variables de proceso, la intensidad, frecuencia y presión ultrasónica (Cárcel *et al.*, 2012; Chandrapala *et al.*, 2012).



**Fig. 1.6.** Formación y crecimiento de burbujas de cavitación

Por otra parte, cuando el colapso de las burbujas producidas por la cavitación se lleva a cabo en la cercanía de la superficie de un sólido, se puede generar una corriente de líquido que atraviesa la burbuja provocando que golpee la superficie del sólido. Este efecto es llamado “**microjet**” y permite el incremento de los fenómenos de transporte de materia y energía entre el sólido y el líquido, disminuyendo el espesor de la capa límite.

En general, muchos de los efectos atribuidos a los ultrasonidos ocurren en presencia de cavitación. Algunos de estos efectos son la desgasificación de líquidos, la generación de radicales libres, la aceleración de reacciones, el incremento de índices de emulsión y de difusión, la mejora en procesos de extracción, la erosión de superficies, etc. (García-Pérez, 2007).

### 1.6.3 Aplicación de los HPU en procesos de inactivación microbiana

En la última década, la tecnología de ultrasonidos de alta potencia (HPU) ha sido ampliamente estudiada con el fin de intensificar y asegurar la calidad de diversos procesos alimentarios (Anaya-Esparza *et al.*, 2017; Cárcel *et al.*, 2012; Ozuna *et al.*, 2015). La energía acústica induce una serie de efectos sinérgicos que pueden producir la inactivación microbiana en alimentos líquidos. El fenómeno de cavitación se asocia principalmente con la formación, crecimiento e implosión de minúsculas burbujas de gas en un líquido cuando los ultrasonidos se propagan a través de él. La cavitación en líquidos puede conducir a la destrucción de las células de microorganismos debido a las temperaturas extremas (5000 K) y a las presiones (1000 atm) generadas en la zona de cavitación (Ozuna *et al.*, 2015; Soria & Villamiel, 2010). Además, los efectos de la cavitación provocan grandes fuerzas de cizallamiento y turbulencia en el medio que pueden afectar la estructura interna de un microorganismo.

Guerrero & Alzamora (2005) utilizaron microscopía electrónica de transmisión, encontrando que el tratamiento con HPU (600 W, 20 kHz, 10-25 min, 45 °C) indujo daño físico en la microestructura celular de *S. cerevisiae* (perforación y ruptura de la pared celular, organelos y discontinuidad del plasmalema), que se atribuyó a la cavitación intracelular inducida por la energía acústica. Resultados similares fueron observados por Cameron *et al.* (2008), Marx *et al.* (2011) y Liu *et al.* (2013) utilizando frecuencias superiores a 20 kHz y potencias acústicas entre 120 y 750 W. Sin embargo, es importante considerar la importancia de la caracterización del campo acústico en sistemas de aplicación de HPU con el objetivo de medir la energía acústica disponible en medios líquidos durante el proceso de inactivación. Esto permitiría contrastar los resultados obtenidos con diferentes dispositivos de HPU.

Además de estos efectos, la energía acústica se asocia con la ruptura de moléculas de agua que generan radicales libres altamente reactivos que pueden modificar las biomoléculas presentes en la membrana celular de diversos microorganismos. Wu *et al.* (2015) estudiaron el daño inducido por HPU a las paredes celulares y a las membranas de *S. cerevisiae*, midiendo la liberación de los polisacáridos de la pared celular y de las proteínas intracelulares, respectivamente. Los ensayos cuantitativos de proteínas y polisacáridos mostraron que los polisacáridos se liberaron más rápidamente que las proteínas a baja intensidad acústica (10 W/m<sup>2</sup>), mientras que las intensidades acústicas más altas (24 y 39 W/m<sup>2</sup>) tuvieron un efecto inverso. Con el aumento de la temperatura, la liberación de los polisacáridos de la pared celular al

medio se favoreció debido a la debilidad de la pared celular inducida por el calor. Del mismo modo, Wordon *et al.* (2012) encontraron mediante análisis de citometría de flujo fluorescente en tiempo real que las lesiones asociadas con la aplicación de HPU eran más evidentes con el aumento de la temperatura. Con el fin de diseñar un proceso de inactivación microbiana óptimo asistido por HPU, es necesario tener en cuenta varios factores que incluyen diferentes parámetros de proceso (potencia ultrasónica, frecuencia, temperatura o volumen, entre otros).

Guerrero *et al.* (2001) estudiaron la influencia de los parámetros de proceso (temperatura, pH y amplitud) en la inactivación de *S. cerevisiae* asistida por HPU. La temperatura y la amplitud de onda fueron las variables más significativas para la inactivación ultrasónica del microorganismo. A 35 y 45 °C, la inactivación microbiana aumentó significativamente, cuando la amplitud de la onda aumentó de 71.4 a 107.1 µm. Sin embargo, las partículas de titanio de la sonda aparecieron en el medio cuando se ensayó la amplitud más alta. A la temperatura más alta ensayada (55 °C), los HPU no contribuyeron a la inactivación de *S. cerevisiae*.

#### 1.6.4 Aplicación de la combinación de SC-CO<sub>2</sub> y HPU

A partir de los resultados de la literatura cabe considerar que el uso de ultrasonidos de potencia en combinación con CO<sub>2</sub> supercrítico puede considerarse como un método prometedor e innovador en la extracción de valiosos compuestos vegetales y productos alimenticios (Mason & Lorimer, 2002). En particular la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, es una técnica que ofrece muy buenos rendimientos y por lo tanto ha ganado amplia aceptación en los últimos años como una alternativa a la extracción con solventes convencionales en muchos procesos analíticos e industriales. La técnica ofrece ventajas relevantes (no tóxico, barato, relativamente inerte y no inflamable) sobre las técnicas tradicionales. La aplicación de ultrasonidos de potencia representa una forma eficiente para mejorar la transferencia de masa del proceso ya que permite la intensificación de la cinética e incrementa el rendimiento.

Por ejemplo, Jun *et al.* (1997), obtuvieron un aumento de aproximadamente el 10% en el rendimiento de la extracción de aceite de germen de trigo empleando ultrasonidos a 26.5 kHz y 35 kHz. La temperatura y presión de extracción fueron de 35 °C y 200-250 bar, respectivamente. Estos autores señalaron que bajo estas condiciones de presión se observó que los ultrasonidos podrían penetrar en el material sólido, provocando micro-turbulencias locales en el interior y disminuyendo la

resistencia a la transferencia de masa entre las partículas. Mejores resultados fueron obtenidos por Riera *et al.* (2004), quienes extrajeron aceite de almendras con CO<sub>2</sub> supercrítico, empleando ultrasonidos a una frecuencia de 20 kHz. Estos autores propusieron que el mecanismo implicado en la mejoría del proceso puede estar relacionado con la turbulencia (agitación intensa), causada por la transmisión acústica. Los resultados obtenidos a 280 bar, 55 °C y 50 W muestran que la cinética de extracción y el rendimiento de la extracción tuvieron un incremento del 30% y 20% respectivamente.

Hasta hace poco, solo se había estudiado el efecto de los fluidos supercríticos asistidos con ultrasonidos, en la extracción de diferentes sustratos, como se indicó anteriormente. Sin embargo, Ortuño *et al.* (2013, 2014) analizaron las ventajas de acoplar un sistema SC-CO<sub>2</sub> discontinuo con ultrasonidos (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) para inactivar microorganismos *S. cerevisiae* y *E. coli*, en medio de cultivo, zumo de manzana y zumo de naranja, a presiones de 10 a 35 MPa y temperaturas de 31 a 41 °C. Empleando SC-CO<sub>2</sub> sin ultrasonidos, se obtuvo una reducción de 6.7 ciclos logarítmicos a 35 MPa, 36 °C y 140 min. En las mismas condiciones pero aplicando SC-CO<sub>2</sub>-HPU, se alcanzó el mismo nivel de inactivación en únicamente 2 min. Se cree que esta reducción en el tiempo de tratamiento se debe a la agitación vigorosa y a la cavitación producida por el campo ultrasónico, lo que aumenta la velocidad de solubilización de SC-CO<sub>2</sub> en el líquido, así como su transferencia de masa a las células microbianas. Además, se reportó que las características del medio afectaban a la velocidad de inactivación. En particular, el contenido de sólidos en el medio, que determina su viscosidad, podría afectar la cavitación relacionada con los HPU.

Por otro lado, Cappelletti *et al.* (2014) estudiaron la aplicación del tratamiento combinado de SC-CO<sub>2</sub> y HPU sobre agua de coco. Estos autores mostraron que para conseguir una reducción de 5 ciclos logarítmicos de microbiota en el agua de coco mediante el tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> (120 bar, 40 °C) fueron necesarios 30 min, mientras que, aplicando HPU se consiguió reducir totalmente la flora microbiana en sólo 15 min bajo las mismas condiciones de tratamiento. Además, respecto al estudio de vida útil, los autores observaron que el agua de coco tratada sólo con SC-CO<sub>2</sub> (120 bar, 40 °C, 30 min) presentó un crecimiento de los microorganismos durante su almacenamiento, mientras que el agua de coco tratada con la técnica combinada de SC-CO<sub>2</sub>-HPU (120 bar, 40 °C, 15 min, 10 W) aseguró una vida útil del producto de 4 semanas.

Considerando los prometedores resultados obtenidos en procesos de inactivación combinando SC-CO<sub>2</sub> y HPU en sistemas en discontinuo o lotes, parece interesante aplicar dicha tecnología a la inactivación microbiana. De mayor interés resulta ser su aplicación en un sistema en continuo que permita mejorar la eficiencia de los tratamientos en discontinuo. Además el procesado en continuo con esta técnica facilitaría enormemente su implementación industrial donde se precisa de sistemas que permitan procesar grandes cantidades de producto a una elevada velocidad.

## REFERENCIAS

- Abaroudi, K. (Enero, 2001). Limpieza de matrices sólidas porosas de interés Medioambiental con fluidos supercríticos. Tesis Doctoral, Universidad de Catalunya.
- Anaya-Esparza, L. M., Velázquez-Estrada, R. M., Roig, A. X., García, H. S., Sayago-Ayerdi, S. G., Montalvo-González, E. (2017). Thermo-sonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*.
- AOAC International. (2007). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 18th edition, 2nd revision.
- Aronsson, K., Lindgren, M., Johansson, B. R., Rönner, U. (2001). Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 41–54.
- Aronsson, K., Rönner, U., Borch, E. (2005). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 19–32.
- Balaban, M. O., Duong, T. (2014). Dense phase carbon dioxide research: Current focus and directions. *Agriculture. Science Procedia*, 2, 2–9.
- Benedito, J., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Ortuño, C., Peña, R. (2011). Procedure of inactivation microorganisms by combination of supercritical fluids and ultrasound. Spain. Patent No. P201131099.
- Benedito, J., Ortuño, C., Castillo-Zamudio, R. I., Mulet, A. (2015). Microbial inactivation by ultrasound assisted supercritical fluids. *Physics Procedia*, 70, 824-827.
- Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108, 383–392.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33.
- Cameron, M., McMaster, L. D., Britz, T. J. (2008). Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 960-964.
- Campos, F. P., Cristianini, M. (2007). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenisation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 226-229.
- Cappelletti, M., Ferrentino, G. Spilimbergo, S. (2014). Supercritical carbon dioxide combined with high power ultrasound: An effective method for the pasteurization of coconut water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 257-263.



- Cárcel, J. A. (2003). Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia. Doctoral dissertation. Universitat Politècnica de Valencia, Spain.
- Cardello, A. V., Schutz, H. G., Leshner, L. L. (2007). Consumer perceptions of foods processed by innovative and emerging technologies: A conjoint analytic study. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 73-83.
- Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200-207.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(5), 975 -983.
- Chemat, F., Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Corona, E. (2013). Caracterización de la calidad de productos cárnicos crudocurados mediante la aplicación de ultrasonidos de señal. (Doctoral dissertation). Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Damar, S., Balaban, M. O. (2006). Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science*, 71(1), R1–R11.
- Daniels, J. A., Krishnamurthi, R., Rizvi, S. S. H. (1985). A review of the effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal Food Protection*, 48, 532-537.
- Del Valle, J. M., Aguilera J. M. (1999). Review: high pressure CO<sub>2</sub> extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology*, 5 (1), 1-24.
- Dillow, A. K., Dehghani, F., Hrkach, J. S., Foster, N. R., Langer, R. (1999). Bacterial inactivation by using near and supercritical carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10344–10348.
- Erkmen, O. (1997). Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Staphylococcus aureus* in broth and milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30, 826–829.
- Erkmen, O. (2000). Antimicrobial effects of carbon dioxide on *Brochothrix thermosphacta* in broth and foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1365–1370.
- Erkmen, O. (2000a). Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* in physiological saline and foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(4), 465–470.

- Erkmen, O. (2002). Effect of carbon dioxide pressure on *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Science and Technology International*, 8(6), 361–364.
- Erkmen, O. (2012). Effects of dense phase carbon dioxide on vegetative cells, in M. O. Balaba, G. Ferrentino (Eds.). *Dense phase carbon dioxide: food and pharmaceutical applications*, (pp. 67-97). USA, Blackwell Publishing Professional.
- Espinosa, S. N. (2001.). *Procesamiento supercrítico de productos naturales modelado, análisis y optimización*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur.
- Fernández, D., Fernández, R. (1997). Fluidos Supercríticos. *Ciencia hoy*, 8, 43.
- Ferrario, M., Alzamora, S. M., Guerrero, S. (2013). Inactivation kinetics of some microorganisms in apple, melon, orange and strawberry juices by high intensity light pulses. *Journal of Food Engineering*, 118, 302–311.
- Ferrario, M., Alzamora, S. M., Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46, 635–642.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L., Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.
- García-González, L., Geeraerd, A. H., Mast, J., Briers, Y., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J. F., Devlieghere, F. (2010). Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment. *Food Microbiology*, 27, 541-549.
- García-González, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S. Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.
- García-Pérez, J. V., Cárcel, J. A., Benedito, J., Mulet, A. (2007). Power ultrasound mass transfer enhancement in food drying. *Food and Bioproducts Processing*, 85(3), 247-254.
- Gómez, P.L., Welti-Chanes, J., Alzamora, S. M. (2011). Hurdle technology in fruit Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 447–465.
- Guerrero, S., López-Malo, A., Alzamora, S. M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(1), 31-39.
- Guerrero, S., Tognon, M., Alzamora, S. M. (2005). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16, 131–139.

- Guerrero-Beltrán, J., Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Ultraviolet-C light processing of grape, cranberry and grapefruit juices to inactivate *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 916–932.
- Isenschmid, A., Marison, I.W., Von Stockar, U. (1995). The influence of pressure and temperature of compressed CO<sub>2</sub> on the survival of yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 39(3), 229–237.
- Ishikawa, H., Shimoda, H., Shiratsuchi, H., Osajima, Y. (1995). Sterilization of microorganisms by the supercritical carbon dioxide micro-bubble method. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1949–1950.
- Jun, C., Yedie, C., Shulai, T., Adschiri, K. (1997). Effects of ultrasound on mass transfer in supercritical extraction. 4th International Symposium on Supercritical Fluids, 707-710.
- Kamihira, M., Taniguchi, M., Kobayashi, T. (1987). Sterilization of microorganisms with supercritical CO<sub>2</sub>. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 407–412.
- Kaya, Z., Unluturk, S. (2016). Processing of clear and turbid grape juice by a continuous flow UV system. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 33, 282–288.
- Kincal, D., Hill, W. S., Balaban, M. O., Portier, K. M., Wei, C. I., Marshall, M. R. (2005). A continuous high pressure carbon dioxide system for microbial reduction in orange juice. *Journal of Food Science*, 70, M249–M254.
- Kincal, D., Hill, W.S., Balaban, M.O., Portier, K.M., Sims, C.A., Wei, C.I., Marshall, M.R. (2006). A continuous high-pressure carbon dioxide system for cloud and quality retention in orange juice. *Journal of Food Science*, 71(6), 338-344.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science y Technology*, 5 (5), 261-266.
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., Schoessler, K. (2011). *Emerging Technologies in Food Processing*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 203-235.
- Knowles, D. E., Richter, B. E., Frede, E., Merk, W. (1988). Supercritical fluid chromatography a new technique for AOAC. *Milchwissenschaft*, 71, 55.
- Lindsay, R. C. (1976). Other desirable constituents of food. *Principles of food science*. In *Food Chemistry*, (New York: Marcel Dekker), p. 491.
- Lin, H-M., Yang, Z. Y., Chen L-F. (1992). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide. *Biotechnology Progress*, 8, 458–461.
- Liu, D., Zeng, X. A., Sun, D. W., Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 132-137.

- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25, 151–158.
- Marx, G., Moody, A., Bermúdez-Aguirre, D. (2011). A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 327-337.
- Mason, T. J., Lorimer, J. P. (2002). *Applied sonochemistry. The uses of power ultrasound in chemistry and processing*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH.
- McClements, D. J., Povey, M. J. W. (1997). Solid fat content determination using ultrasonic velocity measurement. *International Journal of Food Science and Technology*, 59, 697-701.
- McHugh, M. A., Krukonis V. J. (1994). *Supercritical Fluid Extraction, principles and practice*. United, States, Butterworth-Heinemann.
- Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. New, York, CRC, Press.
- Neter, J., Wasserman, W. (1978). In: Richard, D. (Ed.), *Applied Linear Statistical Models*. Irwin, Inc, Homewood, Il.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., Benedito, J. (2013). Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51(2), 474-481.
- Ortuño, C., Quiles, A., Benedito, J. (2014). Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound assisted supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 62, 955-964.
- Oulé, M. K., Tano, K., Bernier, A-M., Arul, J. (2006). *Escherichia coli* inactivation mechanism by pressurized CO<sub>2</sub>. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1208–1217.
- Ozuna López, C. (2014). Estudio de la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad en sistemas sólido-líquido y sólido-gas. Influencia en la cinética de transporte de materia y en la estructura de los productos. Tesis Doctoral, Editorial Universitat Politècnica de València.
- Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*. 77(4), 685–696.
- Palecia, C. (2007). Modelación Matemática de las propiedades de Transferencia de Masa Durante la extracción con Fluidos Supercríticos de Cafeína. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Veracruz.

- Pataro, G., Ferrentino, G., Ricciardi, C., Ferrari, G. (2010). Pulsed electric fields assisted microbial inactivation of *S. cerevisiae* cells by high pressure carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 54, 120-128.
- Parton, T., Toniolo, C., Elvassore, N., Bertucco, A. (2003). Preservation of nutritive properties of tomato sauce by high pressure CO<sub>2</sub> pasteurization. In: *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, Versailles, France
- Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M. A., Benedito, J. (2016). Ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment in continuous regime: Application in *Saccharomyces cerevisiae* inactivation. *Journal of Food Engineering*, 181, 42–49.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Lanciotti, R., Guerzoni, M. E. (2009). Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 26-31.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Riera, E., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., Blasco, M., Mulet, A. (2004). Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3), 241-244.
- Roupas, P. (2008). Predictive modelling of dairy manufacturing processes. *International Dairy Journal*, 18(7), 741-753.
- Raventós, M., Duarte, S., Alarcon, R. (2002). Application and possibilities of supercritical CO<sub>2</sub> extraction in food processing industry: *An overview*. *Food Science and Technology International*, 8(5), 269-284
- Ross, A. I. V., Griffiths, M. W., Mittal, G. S., Deeth, H. C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 125–138.
- Rupasinghe, H. V., Yu, L. J. (2012). *Emerging preservation methods for fruit juices and beverages*. INTECH Open Access Publisher.
- Schneider, G. (1978). Physical.chemical principles of extraction with above-critical gases. *Angew. Chemical*, 90, 62.
- Shimoda, M., Yamamoto, Y., Cocunubo-Castellanos, J., Tonoike, H., Kawano, T., Ishikawa, H., Osajima, Y. (1998). Antimicrobial effects of pressured carbon dioxide in a continuous flow system. *Journal of Food Science*, 63, 709–712.

- Soria, A. C., Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 21(7), 323-331.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A. (2002). Microbial inactivation by high pressure. *Journal of Supercritical Fluids*, 22, 55–63.
- Spilimbergo, S., Bertucco, A. (2003). Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and Bioengineering*, 84, 627–638
- Spilimbergo, S., Dehghani, F., Bertucco, A., Foster, N. R. (2003). Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(1), 118–125.
- Taylor, L. (1996). *Supercritical Fluid Extraction*. New York: A. Wiley-Interscience.
- Tomasko, D., Macnaughton, S., Foster, N. (1993). General Introduction to supercritical fluids. <http://perso.infonie.fr>.
- Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, (18)1, 53-65.
- Wordon, B. A., Mortimer, B., McMaster, L. D. (2012). Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International*, 47(2), 134-139.
- Wu, T., Yu, X., Hu, A., Zhang, L., Jin, Y., Abid, M. (2015). Ultrasonic disruption of yeast cells: Underlying mechanism and effects of processing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 59-65.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

En la actualidad los consumidores demandan productos con características similares a los naturales, por lo que existe un creciente interés por las técnicas de conservación no térmicas. El objetivo de estas nuevas tecnologías es asegurar la conservación de alimentos, manteniendo el valor nutricional y propiedades organolépticas de los productos tratados.

Una de las tecnologías referidas es la aplicación de CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>). Su efecto en la inactivación de enzimas y microorganismos, alterando mínimamente las propiedades sensoriales y nutricionales del alimento, ya ha sido demostrado (Choi et al., 2008). Han sido estudiadas diversas tecnologías, entre ellas los fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia Ortuño et al. (2012; 2013). Dicha tecnología ha sido desarrollada en un sistema en discontinuo que ha presentado drásticas reducciones de tiempo de proceso, comparado con el uso solo de fluidos supercríticos. El efecto de la técnica se atribuye al efecto de los ultrasonidos en el medio, que permiten una vigorosa agitación del medio, una rápida disolución del CO<sub>2</sub> en el medio y por consiguiente un aumento en la velocidad de los mecanismos de inactivación asociados al CO<sub>2</sub> supercrítico. Sin embargo en la industria alimentaria, se precisa de sistemas en continuo que permitan procesar grandes cantidades de producto.

En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue:

### **Objetivo General**

Diseñar, implementar, aplicar y evaluar un sistema de inactivación de microorganismos por contacto medio-(SC-CO<sub>2</sub>) asistido por HPU y de operación en continuo.



**Objetivos Específicos**

Para cumplir el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Diseñar e implementar un sistema de inactivación de microorganismos por contacto medio-(SC-CO<sub>2</sub>) asistido por HPU y de operación en continuo, a partir de un equipo de operación por lotes. La evaluación del proceso se realizará considerando diferentes condiciones de operación, microbiota y medios (zumos) de diferentes características.
- Analizar mediante la modelización matemática el efecto de la presión, temperatura, tiempo de residencia en la inactivación de *S. cerevisiae* inoculada en zumo de manzana, procesado en el equipo SC-CO<sub>2</sub>-HPU de operación en continuo.
- Optimizar el proceso de inactivación de *S. cerevisiae* inoculada en zumo de manzana, procesado en el equipo SC-CO<sub>2</sub>-HPU de operación en continuo.
- Evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de residencia sobre las variables de calidad y la microbiota de zumo de naranja procesado en el equipo SC-CO<sub>2</sub>-HPU de operación en continuo.
- Evaluar el efecto del tiempo de residencia sobre las variables de calidad y la microbiota de zumo de piña procesado en el equipo SC-CO<sub>2</sub>-HPU de operación en continuo.
- Evaluar la microbiota y la degradación de vitamina C en el almacenamiento de zumo de piña procesado en el equipo SC-CO<sub>2</sub>-HPU de operación en continuo.

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral, se desarrolló un plan de trabajo general que se muestra en la Figura 3.1. El plan de trabajo se estructura en cuatro capítulos, que se presentan detalladamente en el apartado de resultados.

El primer capítulo de resultados engloba el rediseño y adaptación del sistema de inactivación de microorganismos mediante fluidos supercríticos (SC-CO<sub>2</sub>) y ultrasonidos (HPU), disponible en el grupo ASPA (Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios, Universitat Politècnica de València) y que opera por lotes, a trabajar en continuo. Así mismo también contempla las pruebas preliminares que se realizaron para lograr que el equipo alcanzara el estado estable por el tiempo requerido para cada ensayo.

En el segundo capítulo se analizó el efecto de la presión, temperatura y tiempo de residencia, así como el empleo o no de HPU sobre la inactivación de *S. cerevisiae*, empleando el sistema de fluidos supercríticos en continuo desarrollado en el primer capítulo. Las relaciones de inactivación se ajustaron a un modelo híbrido (booleano-real) para estudiar el efecto de las variables del proceso y plantear problemas de optimización.

En el tercer capítulo se evaluó el efecto de la temperatura (31, 36 y 41 °C), a 100 bar y 3.06 min de tiempo de residencia, sobre los parámetros de calidad y la microbiota de zumo de naranja tratado con SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continuo. Posteriormente se compararon los resultados con zumo de naranja sometido a un proceso de pasteurización térmica convencional.

Finalmente en el cuarto capítulo se evaluó el efecto del tiempo de residencia (3.06-4.6 min) a 100 bares y 31°C sobre los parámetros de calidad y la microbiota de zumo de piña tratado en el equipo de SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continuo. Además, se analizó la evolución de la microbiota y el contenido de Vitamina C del zumo de piña fresco y tratado mediante SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continuo, durante su almacenamiento a 4 °C.

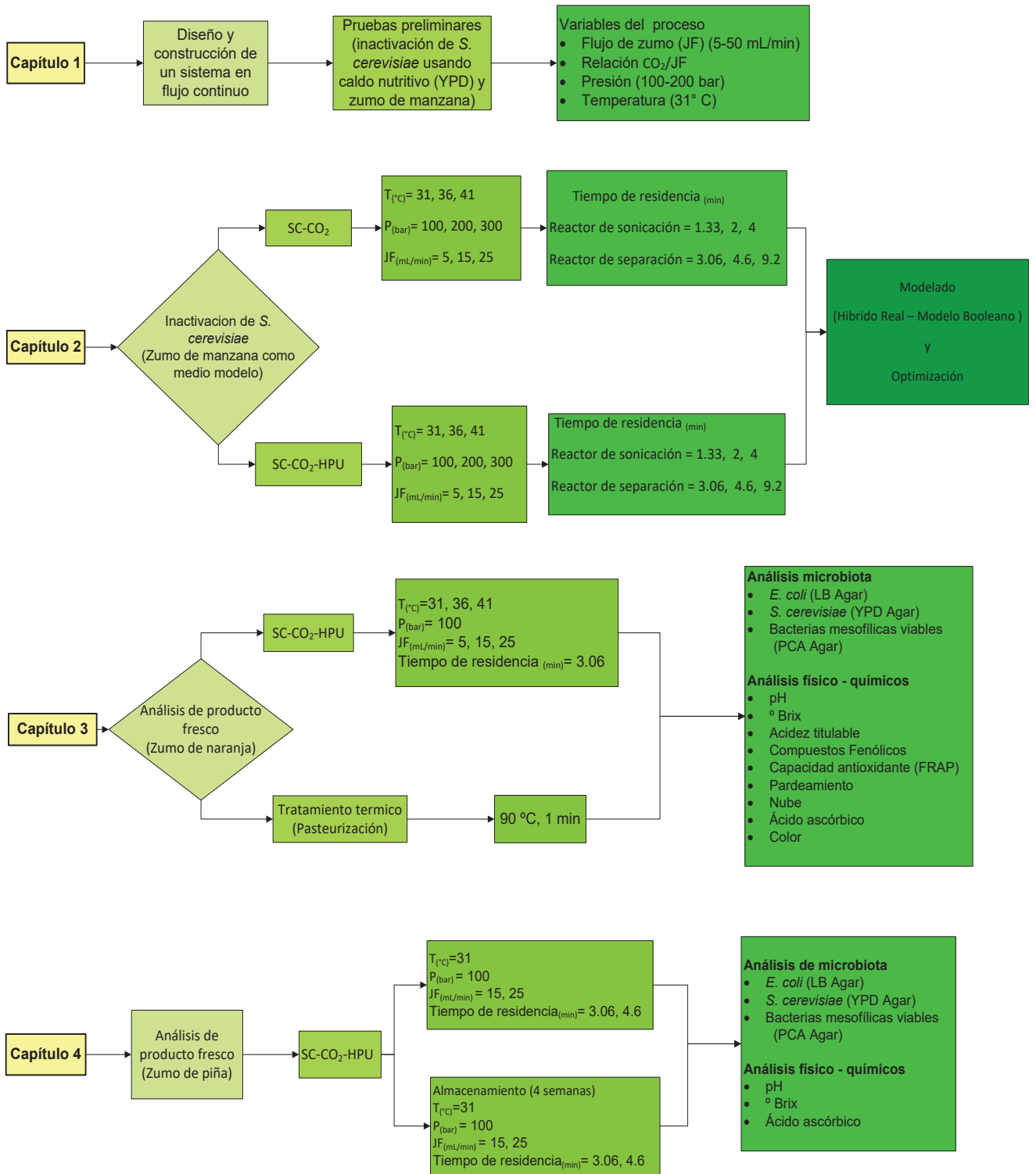
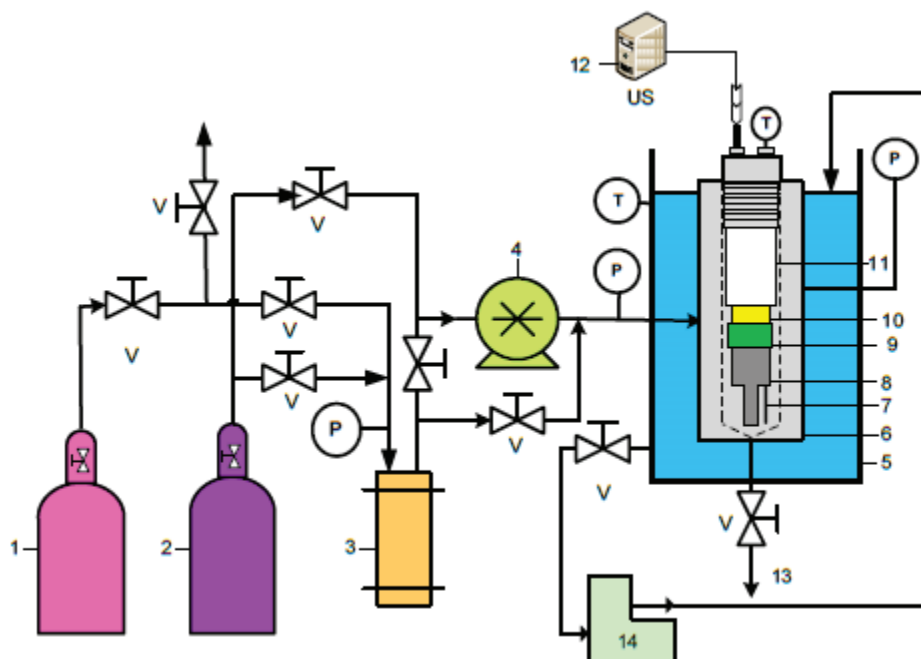


Fig. 3.1. Plan de trabajo

3.2. Equipo de fluidos supercríticos asistido con ultrasonidos de potencia (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) existente en el grupo ASPA. Trabajo por lotes.

A continuación se detalla el equipo de fluidos supercríticos asistido con ultrasonidos de potencia (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) en sistema discontinuo, el cual fue empleado como base para su posterior adaptación a trabajar en continuo.

La planta de fluidos supercríticos (Figura 3.2) fue diseñada y construida por el grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA) de la UPV. El equipo de SC-CO<sub>2</sub> está provisto de un sistema de HPU acoplado al equipo (Benedito *et al.*, 2011).



**Fig. 3.2.** Equipo de fluidos supercríticos asistido por ultrasonidos de potencia en sistema discontinuo. 1. Tanque CO<sub>2</sub>; 2. Tanque de N<sub>2</sub>; 3. Reserva de CO<sub>2</sub>; 4. Bomba de CO<sub>2</sub>; 5. Baño termostático; 6. Depósito de tratamiento; 7. Sonda de temperatura; 8. Transductor; 9. Junta de aislamiento; 10. Cerámicas; 11. Soporte de teflón; 12. Generador de ultrasonidos; 13. Salida para la toma de muestras; 14. Bomba auto-aspirante de recirculación; P: manómetros; T: sensores de temperatura; V: válvulas.

### Tanques de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>

Los gases empleados fueron CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, suministrados por Abelló Linde (Barcelona, España). Ambos gases cumplieron la normativa vigente según el Real Decreto 1466/2009 en materia de aditivos alimentarios dentro de los países de la UE.

El N<sub>2</sub> se adquirió en tanques de 9.5 m<sup>3</sup> de N<sub>2</sub> en condiciones normales y 200 bar de presión, y el CO<sub>2</sub> en tanques de 37.5 kg y 60 bar de presión. Durante todo el desarrollo experimental, ambos tanques se colocaron en un lugar bien ventilado y a temperatura ambiente como establece la normativa.

### Reserva de CO<sub>2</sub>

La reserva de CO<sub>2</sub> (3, Fig. 3.2.) consiste en un depósito de acero inoxidable tipo 316 de 250 mL situado en el interior de un congelador que se mantiene a -18 °C ± 3 °C. Este depósito se conecta a la bala de CO<sub>2</sub> y mantiene en su interior el CO<sub>2</sub> en estado líquido para ser correctamente absorbido por la bomba y posteriormente inyectado al depósito de tratamiento, donde alcanza el estado supercrítico.

### Bomba

La bomba (4, Fig. 3.2.) está constituida por dos bombas de jeringa de 103 mL cada una, de alta presión y precisión (Teledyne ISCO, VERTEX Technics, S.L., Barcelona, España) conectadas a un controlador incorporado en el equipo. La bomba de doble jeringa opera en continuo de manera que, mientras un cilindro carga CO<sub>2</sub> proveniente del depósito enfriador, el otro lo inyecta hacia el recipiente de inactivación.

La bomba se encarga de absorber el CO<sub>2</sub> desde el depósito enfriador y de inyectarlo al depósito de inactivación hasta alcanzar la presión requerida. Ésta funciona en modo de presión constante, en el cual el CO<sub>2</sub> es inyectado usando un caudal de 50 mL/min hasta alcanzar la presión deseada, que se mantiene constante durante todo el tratamiento.

### Depósito de tratamiento

El depósito de tratamiento (6, Fig. 3.2.) consiste en un cilindro de acero inoxidable tipo 316, con un diámetro interno de 30.5 cm y 500 mL de volumen, con un espesor de pared de 3 cm. Dicho depósito se encuentra sumergido dentro del baño termostático, y por tanto, su temperatura era regulada por la temperatura de éste.

El depósito cuenta con un manómetro de muelle sumergido en glicerina (PTG Pressure Technology, Gesellschaft für Hochdrucktechnik mbH, Modelo EN 837-1, Alemania) para verificar la presión en su interior.

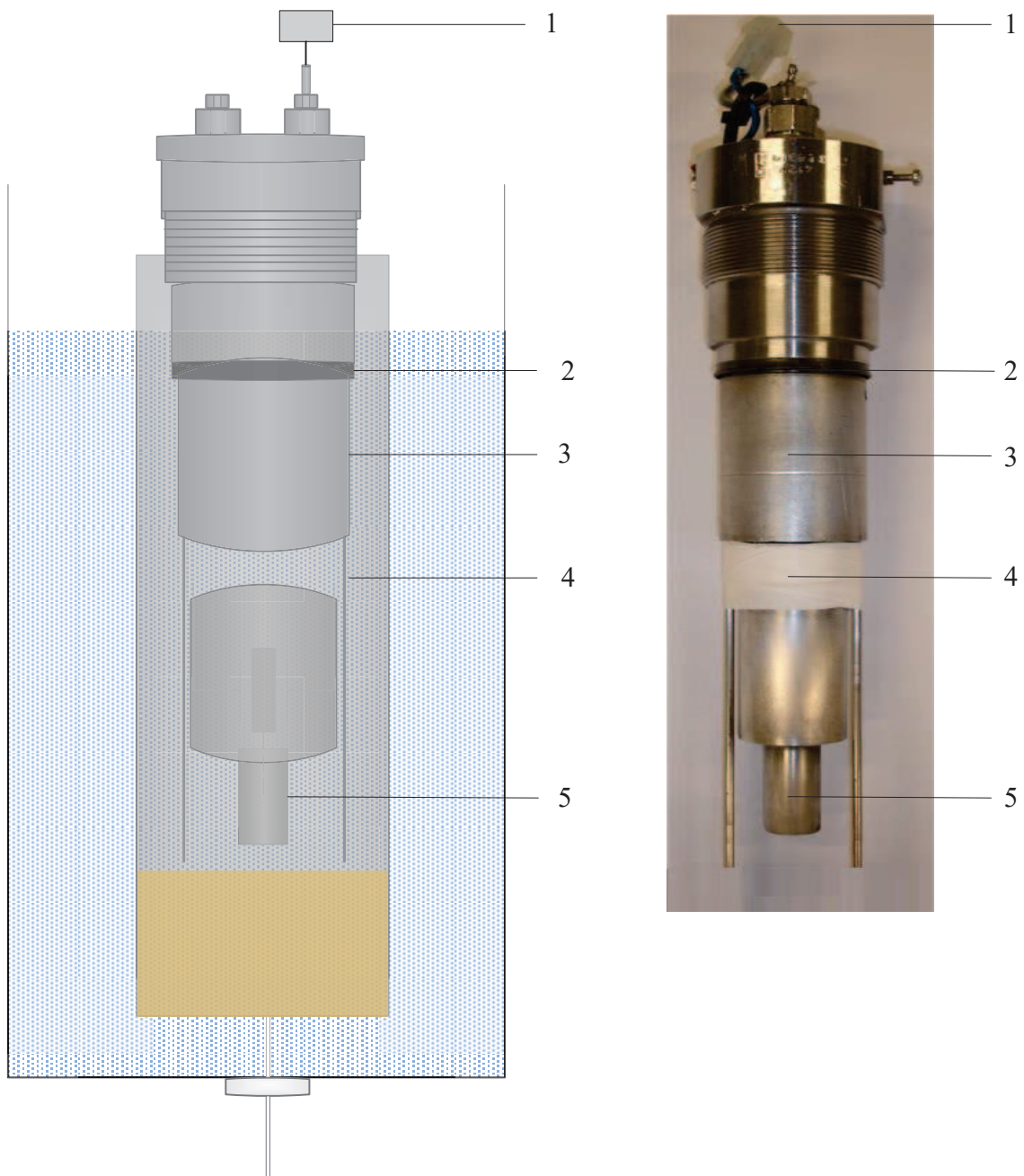
### Baño termostático

El baño termostático (5, Fig. 3.2.) consiste en un baño de agua en el que se sumerge el depósito de tratamiento. Para conseguir la temperatura deseada de proceso, el baño de agua se calienta mediante una resistencia eléctrica sumergible (1500 W-230 V, Ref. 131 CFOR) hasta alcanzar la temperatura deseada en el depósito de tratamiento, que se registra por un termopar conectado a un controlador digital de temperatura (E5CK, Omron, Hoofddorp, Holanda). Dicho termopar se sitúa en el depósito de tratamiento, alcanzando su extremo la parte interna del depósito. La temperatura del tratamiento se cambiaba ajustando el set-point del controlador, manteniéndose constante durante todo el tratamiento. El baño dispone de una bomba auto-aspirante con pre-filtro incorporado (Potencia=1045 W; Modelo SWT75M, Ebara, Madrid, España) que permite recircular continuamente el agua del baño para mantener una temperatura uniforme en el depósito durante todo el proceso.

### Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU)

El sistema de aplicación de ultrasonidos de alta intensidad se basa en un sistema piezoeléctrico. El dispositivo de HPU (Fig. 3.3.) empleado fue patentado, junto con el procedimiento de inactivación por la UPV (Benedito *et al.*, 2011).

El sistema se compone de tres partes principales: un generador que permite convertir la señal eléctrica suministrada de la red (energía eléctrica), a la frecuencia y potencia requeridas durante el tratamiento ( $42 \text{ W} \pm 5 \text{ W}$ ;  $I = 250 \text{ mA} \pm 10 \text{ mA}$ ;  $U = 220 \text{ V} \pm 5 \text{ V}$ ). Dicha potencia es registrada mediante un medidor de potencia digital (Modelo WT210, Yokogawa Electric Corporation, Japón). Un transductor piezoeléctrico, constituido por dos cerámicas comerciales de tipo anular (4, Fig. 3.3: de 35 mm diámetro externo; 12.5 mm diámetro interno; 5 mm de espesor) de 30 kHz de frecuencia, que transforma dicha corriente de alta frecuencia en vibraciones mecánicas (energía acústica) y que está unido al generador mediante una conexión, recubierta con silicona flexible y de alto poder dieléctrico, situada en la cabeza del tapón (1, Fig. 3.3.). Finalmente, la sonda o sonotrodo (5, Fig. 3.3) fabricado en aluminio (calidad 7075), transmite la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar. El transductor junto al sonotrodo, se encuentran unidos al cuerpo del tapón del depósito de inactivación, el cual puede abrirse o cerrarse mediante una rosca dispuesta en la parte superior. Además, para mantener la estanqueidad del depósito, el tapón dispone de una junta de cierre (2, Figura 3.3.). Por otro lado, para evitar cortocircuitos, las cerámicas son cubiertas con teflón y en el cuerpo del tapón, se coloca una funda de polipropileno antes de cada tratamiento.



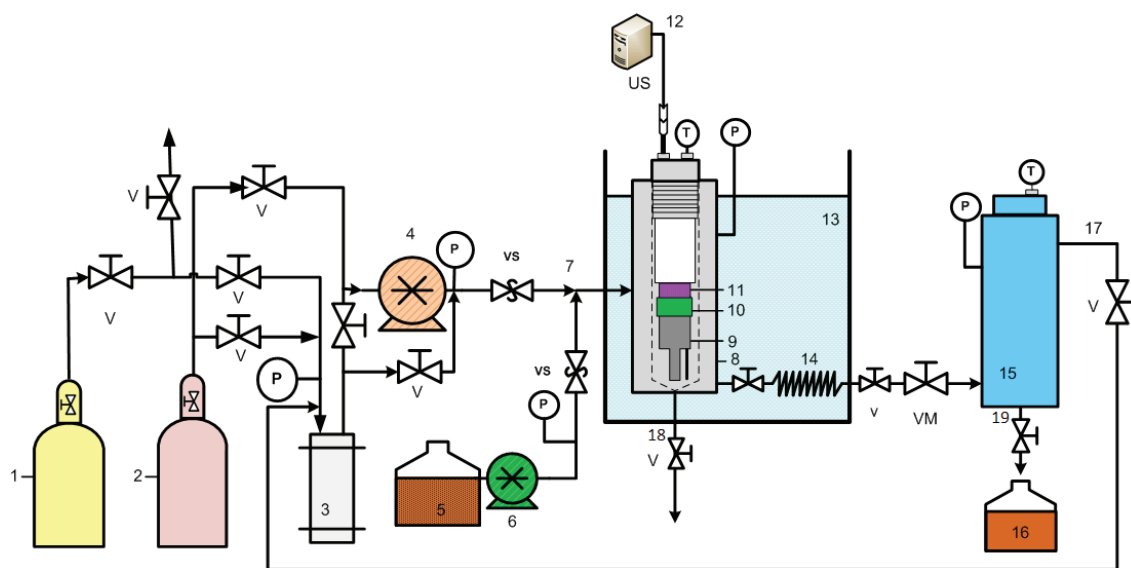
**Fig. 3.3.** Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU) **A.** Vista Real. **B.** Esquema: 1. Conector de entrada de potencia; 2. Junta de cierre; 3. Soporte de aluminio; 4. Cerámicas; 5. Sonotrodo de aluminio.



La primera etapa del proyecto consistió en el rediseño y adaptación del sistema descrito anteriormente. Por lo tanto, en el capítulo 1 del apartado de resultados se detalla la metodología que fue seguida hasta conseguir que el sistema pasara de operar de modo discontinuo a modo continuo.

### 3.3. Equipo de fluidos supercríticos asistido con ultrasonidos de potencia (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) en sistema en continuo

Las experiencias realizadas con SC-CO<sub>2</sub> + HPU en el sistema en continuo se llevaron a cabo en la planta de fluidos supercríticos a escala piloto (Fig. 3.4).



**Fig. 3.4.** Equipo de fluidos supercríticos asistido por ultrasonidos de potencia en sistema en continuo. 1. Tanque CO<sub>2</sub>; 2. Tanque de N<sub>2</sub>; 3. Reserva de CO<sub>2</sub>; 4. Bomba de CO<sub>2</sub>; 5. Depósito muestra a tratar; 6. Bomba de líquido; 7. Punto de mezcla; 8. Depósito de sonicación; 9. Sonotrodo; 10. Sistema de aislamiento; 11. Cerámicas; 12. Generador de ultrasonidos; 13. Baño termostático; 14. Tubo de contacto; 15. Depósito de separación; 16. Muestra; 17. Recirculación de CO<sub>2</sub>; 18. Salida del depósito de sonicación; 19. Salida del depósito de Separación; P: manómetros; T: sensores de temperatura; V: válvulas.

Primero, se procedía al calentamiento del baño termostático para lo cual se conectaba la resistencia y la recirculación del baño, y se especificaba la temperatura deseada en la consigna del controlador de temperatura. El proceso de limpieza se basaba en hacer pasar una disolución (1-4 % v/v) de un jabón industrial para superficies externas (Diversey, Dellated, Barcelona) por el depósito de tratamiento

durante 5 min a temperatura 70 °C. A continuación, se hizo pasar agua destilada por duplicado y por ultimo agua esterilizada.

La carga de las bombas consistía en llenar las mismas de CO<sub>2</sub>. Para ello, en primer lugar se despejaba todo el aire contenido en la reserva de CO<sub>2</sub> que estaba a -18 °C, a continuación se abría el tanque de CO<sub>2</sub> (1, Fig.3.4.) y se llenaba el depósito de reserva (3, Fig. 3.4.). Posteriormente, se abría el tanque de N<sub>2</sub> (2, Fig. 3.4.), se presurizaba el depósito de reserva y se procedía al llenado de las bombas. Una vez alcanzada la presión deseada en el sistema, así como la temperatura de consigna en el baño termostático (ambas controladas automáticamente), se procedía a la preparación de la muestra. Para tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> asistidos por HPU, una vez que se alcanzaba la presión y la temperatura deseada, los HPU eran conectados, momento considerado como tiempo cero de tratamiento. Los HPU suministraban una energía constante de 40 W ± 5 W (I = 250 mA ± 10 mA; U = 220 V ± 5 V) durante todo el tratamiento. La muestra se cargaba en el depósito del líquido a tratar (5, Fig. 3.4.), donde era impulsada por una bomba (6, Fig. 3.4) (previamente estandarizada para conseguir el caudal deseado), hasta el punto de mezcla (7, Fig. 3.4.), donde el CO<sub>2</sub> entraba en contacto con la muestra a tratar, mezclándose a lo largo de todo el sistema hasta llegar al depósito de separación (15, Fig. 3.4.). En dicho depósito se procedía a la despresurización y separación de la muestra y el CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el CO<sub>2</sub> se recirculaba al depósito de reserva para condensarlo y poder ser reutilizado (17, Fig. 3.4). Las muestras tratadas se extraían por un tubo situado en la parte inferior del depósito de separación, tras la limpieza y desinfección del mismo con etanol. Al finalizar cada una de las experiencias, la planta de fluidos supercríticos se limpiaba y desinfectaba con solución desinfectante, alcohol y agua.

Las relaciones flujo líquido/flujo SC-CO<sub>2</sub> fue establecida por regulación de la apertura de la bomba impulsora del líquido. Los resultados alcanzados se muestran en la Tabla 1. Con los resultados referidos y el volumen en el depósito de tratamiento se calcularon los tiempos de residencia que se emplearían en cada experiencia tal y como se explica en el apartado 2, de resultados y discusión.

**Tabla 3.1.** Flujo de líquido tratado obtenido a diferentes presiones y posiciones de medición de la bomba

<b>Apertura de la bomba</b>	<b>Presión (bar)</b>	<b>Flujo de líquido a tratar (mL/min)</b>	<b>Ratio líquido a tratar/CO<sub>2</sub></b>
3.6	100	5	1
4.1	200	5	1
4.9	300	5	1
6.1	100	15	3
7.2	200	15	3
8	300	15	3
8	100	23	4.6
8.4	200	23	4.6
9.4	100	25	5
10.1	200	25	5
11	300	25	5
14.5	100	50	10
15	200	50	10

Los tratamientos empleados, se especifican en cada capítulo de la sección de resultados.

### 3.4. Preparación del cultivo e inóculo

El microorganismo empleado en los estudios de inactivación fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae* T73 (*S. cerevisiae*); comercializada como Lalvin T73 (Lallemand Inc., Montreal, Canadá). El cultivo madre se mantuvo en (YPD) Agar Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar (YPD, Agar, Sigma-Aldrich, USA) almacenado a 4 °C y se resembró mensualmente en nuevas placas de LB Agar.

Para preparar el inóculo de *S. cerevisiae* que posteriormente fue inoculado en la matriz correspondiente, se partió de un cultivo iniciador. Dicho cultivo se preparó inoculando una colonia de *S. cerevisiae* en 50 mL de caldo YPD (YPD Broth, Sigma-Aldrich, USA) a 30 °C y se dejó crecer toda la noche en una cámara incubadora (J.P. SELECTA, Modelo 3000957, Barcelona, España) situada sobre un agitador orbital a 120 rpm (J.P. SELECTA, Rotabit Modelo 3000974, Barcelona, España). 100 µL de ese cultivo se inocularon en 50 mL de YPD Broth estéril y se incubó a 30 °C durante 24 h, tiempo tras el cual se obtuvieron las células de *S. cerevisiae* en fase estacionaria temprana (Ortuño y col., 2012a). Finalmente, usando una micropipeta (SOCOREX Acura 825, 20-200 µL, Suiza), se inoculó 1 L de zumo comercial pasteurizado (Zumo de manzana, Hacendado, España) para obtener una concentración en la muestra de  $1-10 \times 10^7$  UFC/mL.

### 3.5. Viabilidad de los microorganismos

La viabilidad de *S. cerevisiae* en las muestras se determinó por el método de recuento de placas antes y después de cada tratamiento. Las muestras se diluyeron en serie y se sembraron 100 µl de las diluciones apropiadas en agar YPD (YPD Agar, Sigma-Aldrich, EE.UU.) por triplicado. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h antes del recuento. Los resultados experimentales mostrados son la media aritmética y la desviación estándar de  $\log(N/N_0)$  para al menos tres placas, donde  $N_0$  es el número inicial de células en la muestra y  $N$  es el número de células en la muestra después del tratamiento.

Para el análisis de la microbiota tanto de zumo de naranja como de piña se realizaron recuentos de *E. coli* y bacterias mesofilas viables (MVC) y levaduras, específicamente *S. cerevisiae*. Para ello se realizaron diluciones seriadas del zumo tratado con agua destilada esterilizada; 100 µL de la dilución apropiada, se sembraron por triplicado en placas de agar LB, YPD y PCA, para *E.coli*, *S. cerevisiae* y MVC, respectivamente; y se incubaron durante 24 h a 30°C en el caso de *S. cerevisiae* y 37 °C para los otros dos microorganismos, previo a su recuento. Se procedió de la misma forma a la siembra y recuento del zumo control y el tratado. Los resultados se expresan como  $\log(N/N_0)$ , donde  $N_0$  es el número inicial de células en la muestra y  $N$  es el número de células en la muestra después del tratamiento. .

### 3.6. Materia prima

En este trabajo, con el fin de examinar diferentes medios, se emplearon 3 materias primas, zumo de manzana, zumo de naranja y zumo de piña.

En el caso del zumo de manzana se empleó zumo comercial esterilizado (Zumo de manzana, Hacendado, España) para la inoculación de *S. cerevisiae*. Se eligió este zumo como medio modelo, ya que se encontraba libre de otros microorganismos al estar esterilizado y presenta una elevada homogeneidad en sus características composicionales.

En el caso del zumo de naranja, éste se preparó a partir de fruta fresca para determinar si la técnica era viable sobre la materia prima original (sin procesar previamente) con la variabilidad inherente que presenta este producto. Para la preparación del zumo de naranja se partió de naranjas (*Citrus sinensis*), de la variedad Navelate que se adquirieron en un mercado local y se mantuvieron a 4 °C durante dos días como máximo. Previo a la elaboración del zumo, las naranjas eran atemperadas (25 °C) y posteriormente lavadas, peladas, troceadas y exprimidas mediante un extractor de laboratorio (Fig. 3.5, Ultra Juicer, Robot Coupe J80, USA). La extracción del zumo se llevó a cabo justo en el momento previo a la aplicación del tratamiento; por lo que cada experiencia requería una nueva extracción. En cada una de las experiencias se extrajo alrededor de 1.5 L de zumo, de los cuales 1 L era destinado para su procesamiento, tanto en el caso de SC-CO<sub>2</sub> + HPU, como para el tratamiento térmico; y los 0.5 L restantes servían de control.

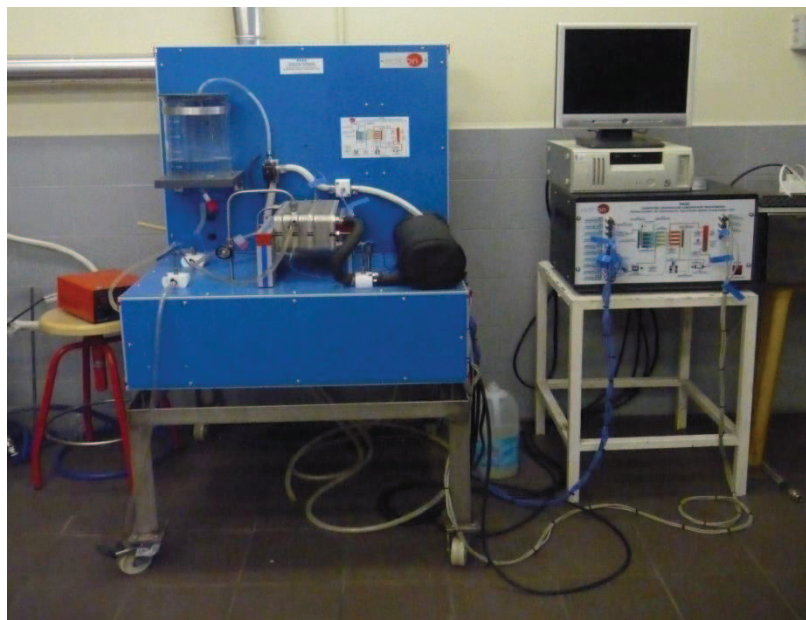
El zumo de piña fue extraído de piña natural (*Ananas comosus L.*) adquirida en un mercado local y almacenada a 4 °C antes de ser utilizada. El zumo de piña fue extraído empleando el mismo procedimiento expuesto anteriormente para la extracción de zumo de naranja.



**Fig. 3.5.** Extractor de zumo Ultra Juicer

### 3.7. Procesamiento térmico

Para evaluar el efecto sobre los parámetros de calidad y sobre la inactivación de la microbiota del zumo de naranja mediante la tecnología térmica convencional, se realizó un tratamiento con un pasteurizador (Fig. 3.6, Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain) a 90°C durante 1 minuto. Para ello, el zumo se colocó en un tanque de alimentación, donde fue impulsado por una bomba a un intercambiador de calor, en el que se calentó rápidamente a la temperatura deseada, trasladándose hasta el tubo de mantenimiento donde permaneció el tiempo de procesado. Tras el tratamiento, el zumo se llevó de inmediato a un baño de agua fría (4°C).



**Fig. 3.6.** Pasteurizador (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain)

### 3.8. Análisis físico-químicos

#### 3.8.1. pH

El pH de las muestras se midió a partir un medidor digital de pH (Fig. 3.7, Crison pH 25, Spain), el cual mide la diferencia de potencial establecida entre los electrodos y que depende de la concentración de hidrogeniones del medio que se analiza. Este aparato es calibrado con soluciones tampón comerciales de pH 4.1 y pH 7.0.

Para su determinación, la muestra se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL a temperatura ambiente con una barra de agitación magnética, y se insertó el electrodo de pH, registrando su valor tras la estabilización. Las mediciones de pH se realizaron por triplicado para cada muestra.



**Fig. 3.7.** Medidor digital de pH.

#### 3.8.2. °Brix

Para la determinación de los grados Brix se empleó un refractómetro digital (Fig 3.8, Digital Hand-held Pocket Refractometer, Atago, Japan), el cual registra la desviación experimentada por la luz polarizada al atravesar una disolución. La lectura realizada corresponde a los sólidos solubles presentes en la disolución, de los cuales más del 80% de los mismos corresponden a azúcares solubles. Las mediciones se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente, tomando el zumo con una pipeta de plástico desechable, y colocando unas gotas en el prisma del refractómetro, determinando directamente así los valores de °Brix. El prisma del refractómetro se limpió con agua destilada antes y después de cada medida. La precisión y la calibración del refractómetro se comprobaron mediante la determinación del índice de refracción para el agua destilada (0.0). El resultado obtenido se expresa como °Brix (g de sólidos solubles/100 mL zumo).



**Fig. 3.8.** Refractómetro digital.

### 3.8.3. Acidez titulable

La acidez titulable determina el número de protones recuperados durante la medida con una base fuerte hasta un punto final especificado. Para ello, siguiendo con la metodología descrita por Kincal *et al.* (2006), se tomaron 5 mL de zumo en un erlenmeyer de 250 mL y se añadieron 15 mL de agua destilada. Posteriormente, se añadieron unas gotas de fenolftaleína como indicador, y se valoró con NaOH 0.1 N hasta que la solución viró a rosa (punto final de la fenolftaleína; pH= 8.2 ± 0.1). Los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron como gramos de ácido cítrico por cada 100 mL de zumo mediante la ecuación 1.

$$\text{Acidez titulable (g ácido/ 100 ml)} = \frac{NV_1F}{V_2} 100 \quad (1)$$

donde:

N= normalidad del hidróxido sódico; F= miliequivalente (ácido cítrico= 0.064)

V<sub>1</sub>= volumen de NaOH empleado en la titulación; V<sub>2</sub>= volumen de muestra (ml zumo)

### 3.8.4. Nube

La nube del zumo de naranja se compone de una suspensión de partículas, las cuales pueden precipitar dando lugar a la clarificación del zumo o pérdida de nube, afectando así al sabor, color y sensación en boca.



Para evaluar la pérdida de nube producida tras el tratamiento, se centrifugaron muestras de 1.5 mL de zumo de naranja en tubos eppendorf a 3600 rpm y 4°C durante 10 min. El valor de la nube se obtuvo a partir de la absorbancia del sobrenadante en cubetas de acrílico de calidad óptica de 1.5 mL a 660 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Fig. 3.9, Thermo Electron Corporation, Helios Gamma Model, Unicam, Reino Unido) y agua destilada como blanco. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

A partir del valor de la absorbancia obtenida, y mediante la ecuación 2, se obtuvo el porcentaje de cambio de nube:

$$\text{Porcentaje de nube} = \frac{\text{valor final} - \text{valor nube inicial}}{\text{valor nube inicial}} 100 \quad (2)$$



**Fig. 3.9.** Espectrofotómetro UV-visible empleado para evaluar cambios en la nube.

### 3.8.5. Índice de pardeamiento

Mediante el índice de pardeamiento se evaluó el efecto del tratamiento sobre este parámetro en el zumo de naranja. Para ello, se centrifugaron muestras de 1.5 mL de zumo de naranja en tubos eppendorf a 12600 rpm y 4 °C durante 10 min. El índice de pardeamiento se obtuvo a partir de la absorbancia del sobrenadante en cubetas de acrílico de 1.5 mL a 420 nm empleando un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation, Helios Gamma Model, Unicam, Reino Unido) tras su filtrado empleando un filtro para jeringa de 0.45 µm (Whatman, Alemania), y empleando agua destilada como referencia. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### 3.8.6. Color

El color se midió a partir de un colorímetro (Spectrophotometer CM- 2500d, Konica Minolta, Japan) basado en tres coordenadas de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). El instrumento se calibró antes de cada uso a partir de una referencia blanca y negra. Los valores de color se expresaron como  $L^*$  (brillo),  $a^*$  (nivel de tono rojo) y  $b^*$  (nivel de tono amarillo).

La diferencia total de color (TCD) se determinó usando la ecuación 3, que indica la magnitud del cambio de color después del tratamiento.

$$TCD=[(L-L_0)^2+(a-a_0)^2+(b-b_0)^2]^{1/2} \quad (3)$$

;

donde:

$L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas de la muestra tras el tratamiento y  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  y  $b_0^*$  los valores de las coordenadas antes del tratamiento. Las diferencias de color perceptibles se califican analíticamente como muy grandes ( $TCD > 3$ ), grandes ( $1.5 < TCD < 3$ ) y pequeñas diferencias ( $TCD < 1.5$ ).



**Fig. 3.10.** Colorímetro

### 3.8.7. Ácido ascórbico

El contenido en ácido ascórbico se determinó por su acción reductora sobre el colorante azul 2,6-diclorofenolindofenol (AOAC 967.21). En primer lugar, se preparó y valoró el indicador 2,6-diclorofenolindofenol. Para su preparación, se precisó una disolución de 50 mg indicador/100 mL de agua destilada y hervida a la que se le añadieron 2 mg de bicarbonato sódico; esta disolución se filtró y almacenó en refrigeración en frasco topacio. Por otra parte, para su valoración, se vertieron en un vaso de precipitados de 25 mL, 10 mL de la solución patrón de ácido ascórbico 250 ppm recién preparada (la cual se preparó disolviendo dicho patrón en ácido metafosfórico al 5%), y se valoró con el colorante hasta la aparición de una coloración

ligeramente rosa que persistió al menos durante 30 segundos. De esta forma, se obtuvo la concentración del indicador.

Para la valoración del contenido de ácido ascórbico en el zumo se introdujeron en un aforado de 50 mL, 10 mL de zumo, 5 mL de solución acuosa de ácido metafosfórico al 25% y se enrasó con agua destilada y hervida. De esta disolución, se tomaron 10 mL y se introdujeron en un vaso de precipitados de 25 mL, dejando caer posteriormente desde la bureta el indicador previamente valorado (de concentración conocida) hasta que la disolución viró a rosa y el color persistió al menos durante 30 segundos. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### 3.8.8. Capacidad antioxidante FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)

La capacidad antioxidante se determinó a partir del método descrito por Pulido *et al.* (2000), con pequeñas modificaciones. Con este método se determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra. A pH bajo y en presencia de un reductor (antioxidante), el complejo de tripiridiltriazina (TPTZ) con Fe (II) se reduce a la forma ferrosa, desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm.

En cubetas de acrílico de 1.5 mL, se mezclaron 30  $\mu$ L de agua destilada; 30  $\mu$ L de zumo (dilución 1:25), patrón (Trolox) o blanco (agua destilada); y 900  $\mu$ L del reactivo FRAP (el cual se obtuvo a partir de 2.5 mL tampón acetato sódico anhidro 0.3 M pH 3.6; 2.5 mL  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  20 milimolar y 2.5 mL TPTZ 10 Mm en HCl 40 mM). Posteriormente, se agitaron todas las cubetas y se midió la absorbancia de las mismas a 595 nm y a 37°C a los 30 minutos a partir de un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation, Helios Gamma Model, Unicam, Reino Unido). Para obtener los resultados, se realizó una curva de calibrado de Trolox con puntos entre 50 y 750  $\mu$ M, representando la concentración del patrón frente a la absorbancia a los 30 minutos. De esta manera, el FRAP de una muestra a los 30 minutos se expresa como concentración equivalente de Trolox a los 30 minutos.

### 3.8.9. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método descrito por Gao *et al.* (2000). El reactivo Folin Ciocalteu es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico de coloración amarilla. Dichos compuestos se reducen al interaccionar con los compuestos fenólicos, originando óxidos de wolframio y molibdeno de color azul que se pueden medir espectrofotométricamente a una absorbancia máxima de 765 nm. Para ello, se mezclaron en un tubo de ensayo, 100  $\mu$ L de zumo (dilución 1:3) o blanco (agua destilada) con 0.2 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 2 mL de agua

destilada; incubando esta mezcla durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadió al tubo 1 mL de carbonato de sodio al 20% y se midió directamente la absorbancia en cubetas de acrílico de 4.5 mL a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation, Helios Gamma Model, Unicam, Reino Unido). La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó con respecto a una curva estándar de ácido gálico con puntos entre 110.4 y 552 ppm, y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o miligramos de ácido gálico por 100 mL de zumo.

### 3.9. Estabilidad durante el almacenamiento

Para evaluar la vida útil de las muestras tratadas mediante SC-CO<sub>2</sub>-HPU, y las muestras sin tratar o control, específicamente en zumo de piña, se realizó un estudio, tanto microbiológico como de vitamina C, durante 4 semanas de almacenamiento tras el tratamiento de SC-CO<sub>2</sub>-HPU (presión 100 bar; temperatura 31 °C y tiempo de residencia 3.06 y 4.6 min).

Para ello las muestras tratadas se envasaron en recipientes de plástico estériles de 60 mL y se guardaron en una nevera (Liebherr, Modelo GKv 5730, Barcelona, España) a 4 °C. Se tomó una muestra tratada y otra control a las 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento, para realizar los análisis correspondientes. Los análisis microbiológicos y de vitamina C se realizaron siguiendo los procedimientos detallados anteriormente. En el análisis microbiológico se evaluó la microbiota (*E. coli*, bacterias mesofilas viables (MVC) y levaduras) presente en cada muestra.

### 3.10. Modelo estadístico

Se evaluó un modelo híbrido booleano-real con el fin de analizar el efecto de las variables del proceso sobre la inactivación de *S. cerevisiae*. El modelo fue una función del tipo.  $f: \mathcal{A}^3 \times \mathcal{B} \rightarrow \mathcal{R}_+$  donde  $\mathcal{A} = [-1,1]$ ,  $\mathcal{B} = \{0, 1\}$  y  $\mathcal{R}_+$  Es el campo positivo de los números reales. Esto significa que las tres variables de proceso fueron codificadas linealmente como:

$x_1 = f_{11}(\tau_{SoV})$  o  $x_1 = f_{11}(\tau_{ToT})$ ,  $x_2 = f_2(T)$  y  $x_3 = f_3(P)$  donde  $f_1$ ,  $f_2$  y  $f_3$  Son funciones lineales, de manera que cada combinación  $(x_1, x_2, x_3) \in \mathcal{A}$ ; Y se utiliza una variable booleana  $x_4 \in \mathcal{B}$  para definir la aplicación o no de los ultrasonidos. Las variables codificadas se definieron mediante las Ecs. 4–6.

$$x_1 = \frac{\tau_{SoV} - 2.667}{1.333} \in \mathcal{A} \quad \text{para la salida del recipiente sonicación} \quad (4a)$$

$$x_1 = \frac{\tau_{ToT} - 6.133}{3.033} \in \mathcal{A} \quad \text{para la salida del separador} \quad (4b)$$

$$x_2 = \frac{T - 36}{5} \in \mathcal{A} \quad (5)$$

$$x_3 = \frac{P - 200}{100} \in \mathcal{A} \quad (6)$$

Donde los valores constantes en las ecuaciones 3-5 se calcularon de modo que cualquier variable codificada debe estar en el intervalo de -1 a 1.

La variable booleana se definió como:

$$x_4 = \begin{cases} 0 & \text{para el proceso sin ultrasonidos} \\ 1 & \text{para el proceso con ultrasonidos} \end{cases} \quad (7)$$

Con el fin de asegurar que la respuesta siempre fuera positiva, se definió como la Ec. 8.

$$y = -\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \in \mathcal{R}_+ \quad (8)$$

El modelo híbrido vino definido por la Ec. 9.

$$\begin{aligned} y = & (\beta_0 + \gamma_0 x_4) + (\beta_1 + \gamma_1 x_4)x_1 + (\beta_2 + \gamma_2 x_4)x_2 + (\beta_3 + \gamma_3 x_4)x_3 + (\beta_{11} + \gamma_{11} x_4)x_1^2 \\ & + (\beta_{12} + \gamma_{12} x_4)x_1 x_2 + (\beta_{13} + \gamma_{13} x_4)x_1 x_3 + (\beta_{22} + \gamma_{22} x_4)x_2^2 \\ & + (\beta_{23} + \gamma_{23} x_4)x_2 x_3 + (\beta_{33} + \gamma_{33} x_4)x_3^2 \end{aligned} \quad (9)$$

Con el modelo híbrido propuesto es posible realizar una evaluación estadística del efecto de los HPU a través de la significación de los parámetros (Neter & Wasserman, 1978).

El mismo modelo se ajustó por separado a los dos conjuntos de resultados experimentales: los datos de inactivación para la salida del recipiente de sonicación (definidos en la Ec. 4a) y para la salida del recipiente de separación (definidos en la Ec. 4b).

### 3.11. Análisis Estadístico

Mediante el software Statgraphics Centurion XVI, se realizaron ANOVAS multifactoriales y pruebas Tuckey para evaluar el efecto de los tratamientos empleados.

### REFERENCIAS

- AOAC International. (2007). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 18th edition, 2nd revision.
- Benedito, J., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Ortuño, C., Peña, R. (2011). Procedure of inactivation microorganisms by combination of supercritical fluids and ultrasound. Spain. Patent No. P201131099.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L., Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.
- Kincal, D., Hill, W.S., Balaban, M.O., Portier, K.M., Sims, C.A., Wei, C.I., Marshall, M.R. (2006). A continuous high-pressure carbon dioxide system for cloud and quality retention in orange juice. *Journal of Food Science*, 71(6), 338-344.
- Neter, J., Wasserman, W. (1978). In: Richard, D. (Ed.), *Applied Linear Statistical Models*. Irwin, Inc, Homewood, Il.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.

# **4.RESULTS AND DISCUSSION**

---

# CHAPTER 1

---

**DESIGN CONSTRUCTION AND SET-UP OF THE  
ULTRASOUND-ASSISTED SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub>  
CONTINUOUS FLOW SYSTEM**

**DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CONFIGURACIÓN DEL  
SISTEMA EN FLUJO CONTINUO DE CO<sub>2</sub>  
SUPERCRÍTICO ASISTIDO POR ULTRASONIDOS**



## Design construction and set-up of the ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> continuous flow system

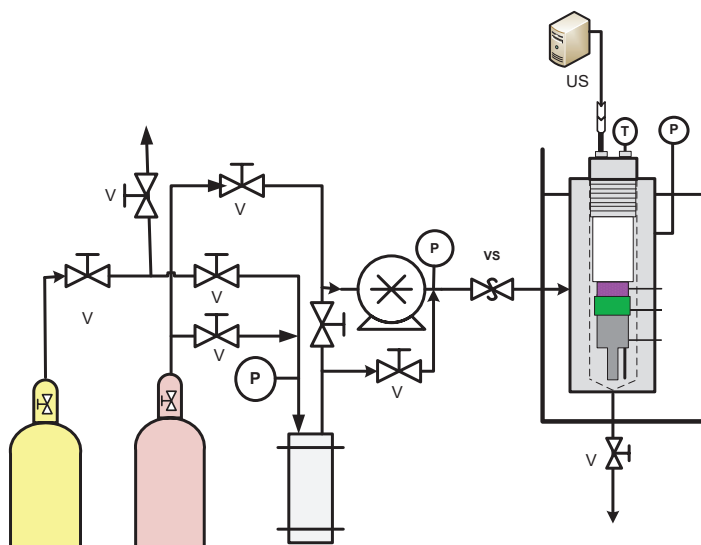
### 1. Design and construction of the system

The first stage of the work consisted on the adaptation of a batch system (the system has been described in section 3, Methodology and Methods) for the inactivation of microorganisms by means of a combination of supercritical fluids (SC-CO<sub>2</sub>) and ultrasound (HPU), existing in the ASPA group, for working in continuous mode.

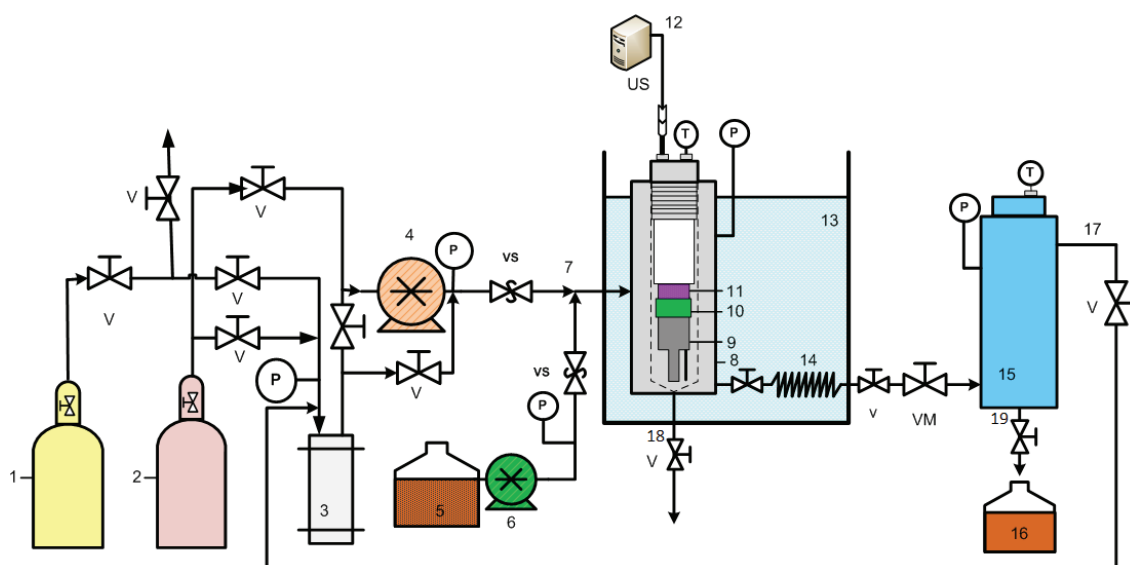
During this stage, the equipment was redesigned under the premise of using as much the existing parts of the former plant as possible, while maintaining the safety requirements needed for this kind of pressure installations. Moreover, the design took into consideration the need to extend the contact time (residence time) between the supercritical CO<sub>2</sub> and the product undergoing the continuous process treatment. Accordingly, the purchased new material basically consisted of a Lewa high pressure pump (Lewa, FC micro-metering pump, Germany), a support system for the pump and the separation tank and the required ancillary elements (valves, elbows, pipes, etc.).

The installation step included the redistribution of all the elements in order to adapt them to the new situation where more space was needed to add a separation tank and a high pressure pump.

The equipment was modified as shown in Figures C.1.1 and C. 1.2.



**Fig C.1.1.** Supercritical CO<sub>2</sub> batch treatment system existing in the ASPA group

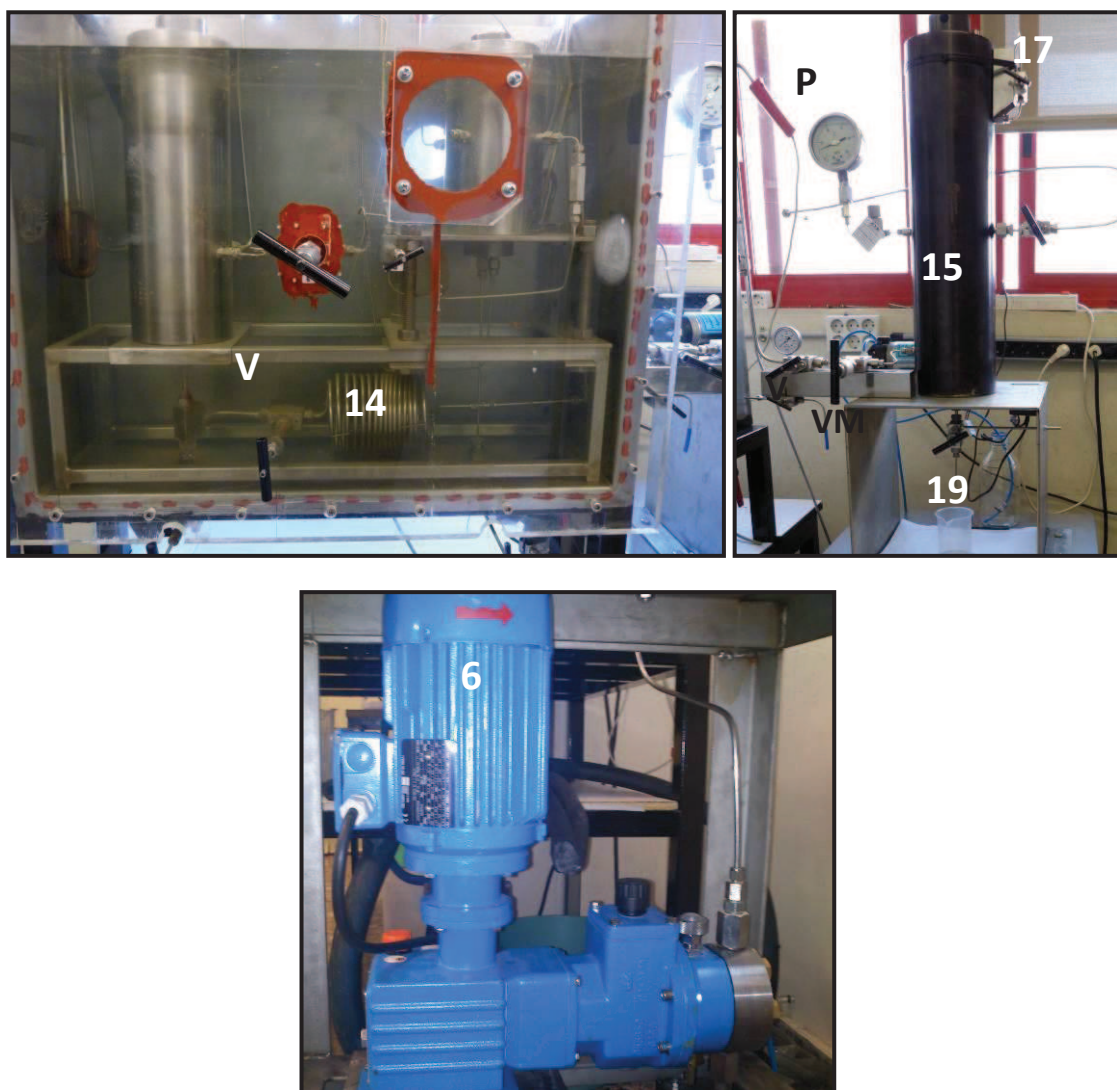


**Fig. C.1.2.** Supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO<sub>2</sub> tank; 2. N<sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO<sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Holding contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO<sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.

As can be observed by comparing Figures C.1.1 and 2, different elements were added to the new equipment: a tank for the liquid undergoing treatment (5), a liquid metering pump (6), a holding tube (14), a separation tank (15) and a CO<sub>2</sub> recirculation system (17). This was in addition to valves, pressure gauges and the connections necessary to ensure the correct operation and safety of the equipment.

In the new system, the liquid to be treated was maintained in the liquid reservoir (1L capacity) and pumped by the newly installed pump (6, Figure C.1.2). The liquid was mixed in the mixing point (7, Figure C.1.2) and sent to the sonication vessel (8, Figure C.1.2). In this vessel the liquid was treated with or without HPU. Subsequently the liquid exited the sonication vessel and entered the holding tube (14, Figure C.1.2; 3 mm diameter and 733 cm length, volume of 52 mL) and, finally the liquid arrived to the separation vessel (15, Fig. C.1.2; 2080 mL) where the CO<sub>2</sub> was separated from the treated liquid (16, Figure C.1.2). The liquid was collected using the separation vessel output (19, Figure C.1.2). More details on the operation procedure of the plant are given in section 2.3 of this chapter.

For illustration, in Figure C.1.3, pictures of the equipment are shown where each element is numbered.



**Fig. C.1.3.** Pictures of the added elements in the supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system. 6. Liquid Pump; 14. Continuous contact tube; 15. Separation vessel; 17. CO<sub>2</sub> Recirculation; 19. Separation vessel output, V. valve; VM. micrometric valve; P. Manometer.

After the continuous system was assembled, the liquid pump and the installation were fixed in order to characterize its flow behavior under different pressure conditions. The pump flow could be regulated through a metering screw from 0 to 15, though the range of study was between 3.6- 15 to get a flow of distilled water from 5-50 mL/min. Distilled water was pumped together with a constant flow of CO<sub>2</sub> (5 mL/min) to the system, under different pressure, temperature and water/CO<sub>2</sub> flow ratios. The results are show in Table C.1.1. The tests have shown that the device designed allowed to

simultaneously pump and bring into contact the supercritical CO<sub>2</sub> and a liquid in continuous mode.

**Table C.1.1** Flow of treated liquid obtained at different pressures and pump metering positions

Pump metering screw position	Pressure (bar)	Flow distilled water (mL/min)	Flow Ratio water/CO <sub>2</sub>
3.6	100	5	1
4.1	200	5	1
4.9	300	5	1
6.1	100	15	3
7.2	200	15	3
8	300	15	3
8	100	23	4.6
8.4	200	23	4.6
9.4	100	25	5
10.1	200	25	5
11	300	25	5
14.5	100	50	10
15	200	50	10

## 2. Set-up of the ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> continuous flow system

### 2.1. Microbial preparation

The microbial strain used in the set-up of the new continuous system was *S. cerevisiae* T73 (*S. cerevisiae*). It is a natural strain isolated from wine fermentation in Alicante (Spain) (Querol *et al.*, 1992), and it is commercialized as Lalvin T73 (Lallemand Inc., Montreal, Canada).

### 2.2. Sample preparation and growing conditions

A single colony of *S. cerevisiae* T73 was inoculated in Yeast Peptone Dextrose Broth (YPD Broth, Sigma-Aldrich, USA) and grown overnight at 30 °C, using an incubation chamber (J.P. SELECTA, Model 3000957, Barcelona, Spain) and an orbital shaker at 120 rpm (J.P. SELECTA, Rotabit Model 3000974, Barcelona, Spain). For each experiment, a subculture was prepared by inoculating 100 µL of the starter in 100 mL of sterilized medium and incubated at 30 °C for 24 h to obtain cells in the stationary phase. Growth curves were determined in advance by both plating and the measurement of absorbance at 625 nm (data not shown).

### 2.3. Supercritical fluid processing

The volume of the liquid phase during the experiments in the sonication vessel was 40 mL. The holding tube, analog to a PFR, had a volume of 52 mL. The HPU system (9-12, Fig. C.1.1.) has been patented (Benedito *et al.*, 2011) in conjunction with the inactivation procedure and consists of a high power piezoelectric transducer, an insulation system and a power generator unit. The transducer ( $>1 \text{ W/cm}^2$ ) was inserted inside the inactivation vessel and included two commercial ring-shaped ceramics (11, Fig. C.1.2; 35 mm external diameter; 12.5 mm internal diameter; 5 mm thickness; resonance frequency of 30 kHz) and a sonotrode (9, Fig. C.1.2), which was specially built to concentrate the highest amount of acoustic energy on the application point. The transducer was powered with constant energy by the power generator unit (12, Fig. C.1.2) during the SC-CO<sub>2</sub> process.

The SC-CO<sub>2</sub>-HPU processing applied to the liquid was as follows: first, liquid carbon dioxide was supplied from the tank to the chiller reservoir (which stores it at -18 °C) to the pump where it was compressed at the target pressure. To start processing, the equipment was stabilized at the treatment pressure ( $P$ ) and temperature ( $T$ ) only with SC-CO<sub>2</sub> at a constant flow rate of 5 mL/min. Thereafter, the ultrasound equipment was connected, and once the process conditions ( $P, T$ ) were attained, the sample to be treated was pumped to the mixing point (7, Fig.C.1.2) where it mixed with the SC-CO<sub>2</sub>. The mix went into the sonication vessel (8, Fig.C.1. 2), where the HPU was applied. For the experiments with HPU, the power applied during the whole experiment was  $40 \text{ W} \pm 5 \text{ W}$  ( $I = 250 \pm 10 \text{ mA}$ ;  $U = 220 \pm 5 \text{ V}$ , measured with a Digital Power Meter, Yokogawa, Model WT210) and the frequency  $30.7 \pm 1.8 \text{ kHz}$ . Pressure and temperature were kept constant during the experiment. The mixture of liquid/SC-CO<sub>2</sub>

exiting the treatment vessel went into the holding tube (14, Fig. C.1.2) and, finally, into the separation vessel (15, Fig. C.1.2). Prior to each experiment, the different sections of the equipment where the product flows through were cleaned and sanitized with disinfectant solution (Delladet VS2, Diversey, Spain), and distilled and autoclaved water.

### 2.4. Enumeration of viable microorganisms

The viability of *S. cerevisiae* in the samples was determined by the plate count method before and after every treatment. Samples were serially diluted and 100  $\mu$ L of the appropriate dilutions were plated on Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD Agar, Sigma-Aldrich, USA) in triplicate. The plates were incubated at 30 °C for 24 h before counting. The experimental results shown are the arithmetic mean and the standard deviation of  $-\log(N/N_0)$  for at least three plates, where  $N_0$  is the initial number of cells in the control sample and  $N$  is the number of cells in the sample after the different treatment times.

### 2.5. Inactivation tests using YPD broth as the treatment medium

To validate that the designed and built continuous equipment was capable of inactivating microorganisms in a simple medium, *S. cerevisiae* ( $1 \times 10^7$  cfu/mL) was inoculated in YPD Broth. Then the medium was treated with SC-CO<sub>2</sub> and SC-CO<sub>2</sub>-HPU in the continuous flow system at 31 °C (at the lowest temperature necessary to bring the CO<sub>2</sub> to the supercritical state), 2 pressures (100 and 200 bar) and 2 different flow rates (5 and 50 mL/min). The pressure and temperature conditions were selected to affect as the least the quality properties of the liquid undergoing the treatment. The logarithmic reductions obtained after the different treatments are shown in Table C.1.2.

**Table C.1.2.** Reduction ( $\log(N/N_0)$ ) of *S. cerevisiae* inoculated in YPD Broth ( $1 \times 10^7$  cfu/mL) and treated with SC-CO<sub>2</sub> and SC-CO<sub>2</sub>-HPU in continuous mode at 31 °C and constant flow of CO<sub>2</sub> (5 mL/min).

Sample flow rate (mL/min)	Pressure (bar)	SC-CO <sub>2</sub> -log(N/N <sub>0</sub> )	SC-CO <sub>2</sub> -HPU -log(N/N <sub>0</sub> )
5	100	NC	NC
	200	NC	NC
50	100	0	4.56 ± 0.055 <sup>a</sup>
	200	0	3.75 ± 0.59 <sup>a</sup>

NC: No count, without growth of microorganisms

Different letters within a column for the same flow rate indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

At a YPD broth flow rate of 5 mL/min, after the treatment with SC-CO<sub>2</sub> and SC-CO<sub>2</sub>-HPU no growth of microorganisms was observed under any of the conditions studied. Thus, the initial population was completely inactivated. When the YPD flow rate was increased to 50 mL/min, after the SC-CO<sub>2</sub> treatment, the population of microorganisms was not reduced at any pressure considered. However, when SC-CO<sub>2</sub> and HPU were combined, the level of inactivation reached  $4.56 \pm 0.055$  and  $3.75 \pm 0.59$ , at 100 and 200 bar, respectively. Therefore, no significant ( $p > 0.05$ ) effect was found for pressure, being the flow of sample the only significant ( $p < 0.05$ ) factor in experiments conducted on YPD broth. That means that the residence time is the main factor to account for. The increase of the liquid flow results in a decrease of the treatment residence time and consequently in the inactivation reached in the system.

## 2.6. Inactivation of *S. cerevisiae* using apple juice as the treatment medium

Inactivation was also analyzed by processing commercial apple juice (Apple juice, Hacendado, Spain) to assess the inactivation capacity of the new system in a more complex medium. The apple juice was inoculated with a cell concentration of  $10^7$  cfu/mL. In a process similar to that used for YPD Broth, the juice was also submitted to SC-CO<sub>2</sub> and SC-CO<sub>2</sub>-HPU, at pressures of 100 and 200 bar (31 °C). Based on the results obtained for the YPD Broth, an intermediate flow rate of 23 mL/min was also selected for the apple juice. The microbial inactivation results are show in Table C1.3.

**Table C.1.3.** Reduction ( $\log(N/N_0)$ ) of *S. cerevisiae* inoculated in apple juice ( $1 \times 10^7$  cfu/mL) and treated with SC-CO<sub>2</sub> and SC-CO<sub>2</sub>-HPU in continuous mode at 31 °C and constant flow of CO<sub>2</sub> (5 mL/min).

Sample flow (mL/min)	Pressure (bar)	SC-CO <sub>2</sub> -log(N/N <sub>0</sub> )	SC-CO <sub>2</sub> -HPU -log(N/N <sub>0</sub> )
5	100	NC	NC
	200	NC	NC
23	100	1.47 ± 0.14 <sup>a-1</sup>	5.13 ± 0.58 <sup>a-2</sup>
	200	1.51 ± 0.07 <sup>a-1</sup>	4.55 ± 0.12 <sup>a-2</sup>
50	100	1.96 ± 0.70 <sup>a-1</sup>	4.01 ± 1.11 <sup>a-2</sup>
	200	1.53 ± 0.03 <sup>a-1</sup>	3.60 ± 0.16 <sup>a-2</sup>

NC: No count, without growth of microorganisms

Different letters within a column for the same flow indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

Different numbers within a row for the same flow and pressure indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

At a flow rate of 5 mL/min, and after undergoing SC-CO<sub>2</sub> or SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment, no growth of microorganisms was reported, being the initial population of *S. cerevisiae* completely inactivated.

An average reduction of 1.5 log cycles with SC-CO<sub>2</sub> at a flow rate of 23 mL/min was achieved for the apple juice, and no significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between 100 and 200 bar. When the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment was employed the level of inactivation reached  $5.13 \pm 0.58$  and  $4.55 \pm 0.12$  log cycles, at 100 and 200 bar, respectively, being the differences not significant ( $p > 0.05$ ) between both pressures. However, for 23 mL/min, the treatment of SC-CO<sub>2</sub>-HPU allowed a significant ( $p < 0.05$ ) increase of microbial inactivation of approximately 3 log cycles, compared to treatments using only SC-CO<sub>2</sub>.

In the SC-CO<sub>2</sub> treatments, when the flow rate increased up to 50 mL/min, no significant ( $p > 0.05$ ) effect on inactivation was found compared to the experiments at 23 mL/min. Moreover, no significant ( $p > 0.05$ ) effect was found for pressure, reaching an average inactivation of 1.74 log cycles. When the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment was applied, the microbial reduction was  $4.01 \pm 1.11$  and  $3.60 \pm 0.16$  log cycles, at 100 and 200 bar, respectively. At 100 bar, the flow increase from 23 to 50 mL/min had no significant effect ( $p > 0.05$ ) on inactivation; however, at 200 bar, the flow increase produced a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the inactivation. At 50 mL/min the application of HPU also brought about a significant ( $p < 0.05$ ) increase in microbial inactivation.



The mechanisms of inactivation associated with supercritical CO<sub>2</sub> involve the dissolution of CO<sub>2</sub> in the medium, the reduction of pH, increased fluidity of the cell membrane of microorganisms, penetration of CO<sub>2</sub> into cells and alteration of their cellular balance, which results in their inactivation (García-González *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Damar *et al.*, 2009). The contact between CO<sub>2</sub> and the cells is necessary to observe the inactivation produced by the CO<sub>2</sub>. If the sample flow decreases, the contact time will be longer. Therefore, an increase in the level of inactivation could be expected. A more detailed explanation between the flow rate and the contact time (residence time), will be given in Chapter 2 of the results and discussion section. In this study, after the SC-CO<sub>2</sub> treatment, at 5 mL/min, a complete inactivation was achieved, compared to 23 mL/min and 50 mL/min for which an average of 1.6 log cycles was obtained and no significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) between both flows.

In SC-CO<sub>2</sub> treatments, the agitation generated by the HPU allows a rapid saturation of CO<sub>2</sub> in the medium and improves the contact between the CO<sub>2</sub> and the microbial cell walls, which might accelerate the inactivation mechanisms (Ortuño *et al.*, 2012a, 2012b, 2013, 2014). As a result, in this study, when HPU was applied, the level of inactivation increased significantly in all the treatments, compared to the treatments with SC-CO<sub>2</sub> alone. In the experiments with a small flow rate of 5 mL/min, using only SC-CO<sub>2</sub>, the residence time in the equipment was long enough to observe complete inactivation and therefore, the application of HPU was not necessary.

### 3. Conclusions

The application of SC-CO<sub>2</sub>-HPU processes in continuous mode allows to obtain acceptable inactivation levels. In this way, using mild temperature and pressure values, the negative effects on the organoleptic and nutritional properties of the juice such as flavor, odor, and vitamins could be avoided. These negative effects are common in heat treatments, where temperatures much higher than those used in this study are applied.

### 4. References

- Benedito, J., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Ortuño, C., Peña, R. (2011). Procedure of inactivation microorganisms by combination of supercritical fluids and ultrasound. Spain. Patent No. P201131099.
- Choi, Y.M., Bae, Y.Y., Kim, K.H., Kim, B.C., Rhee, M.S. (2008). Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *E. coli* O157:H7 in marinades and marinated pork. *Meat Science*, 82, 419-424.
- Damar, S., Balaban, M., Sims, C. (2009). Continuous dense-phase CO<sub>2</sub> processing of coconut water beverage. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 666-673.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M., Mulet, A., Benedito, J. (2012a). Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *Journal of Supercritical Fluids*, 63, 8-15.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M., Mulet, A., Benedito, J. (2012b). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15, 31-37.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., Benedito, J. (2013). Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51, 474-481.
- Ortuño, C., Quiles, A., Benedito, J. (2014). Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 62, 955–964.

# CHAPTER 2

---

**ULTRASOUND-ASSISTED SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub>  
TREATMENT IN CONTINUOUS REGIME: APPLICATION  
IN *S. Cerevisiae* INACTIVATION**

**TRATAMIENTO DE CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO ASISTIDO POR  
ULTRASONIDOS EN REGIMEN CONTINUO:  
APLICACIÓN EN LA INACTIVACIÓN DE *S. Cerevisiae***

Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M.A.,  
Benedito, J.

*Journal of Food Engineering*  
(2016), 181, 42-49

## Ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment in continuous regime: application in *S. cerevisiae* inactivation

Paniagua-Martínez, I.<sup>1,2</sup>, Mulet, A.<sup>1</sup>, García-Alvarado, M.A.<sup>2</sup> Bedito, J.\*<sup>1</sup>

1: Food Technology Department. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, Valencia, Spain.

2: Chemical and Biochemical Engineering Department. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel A. de Quevedo 2779. Veracruz,

### Abstract

Laboratory continuous regime equipment was designed and built for supercritical CO<sub>2</sub> microbial inactivation assisted by high power ultrasound (SC-CO<sub>2</sub>-HPU). Apple juice, previously inoculated with 1-10x10<sup>7</sup> CFU/mL of *Saccharomyces cerevisiae*, was treated in the equipment at different juice residence times (3.06-9.2 min), temperatures (31-41 °C) and pressures (100-300 bars). Inactivation ratios were fitted to a hybrid (boolean-real) model in order to study the effect of the process variables. The maximum inactivation achieved by the system was 7.8 log-cycles. The hybrid model demonstrated that HPU has a significant effect on inactivation after shorter residence times. A multi-objective optimization performed with the hybrid model showed that 6.8 log-cycles of inactivation could be obtained after a minimum residence time (3.1 min) with HPU application, whereas under the same conditions but without HPU, the inactivation would be 4.3 log-cycles. Therefore, the ultrasound assisted continuous system has shown a great potential for microbial inactivation using SC-CO<sub>2</sub> under mild process conditions.

**Keywords:** Non-thermal process; supercritical CO<sub>2</sub>; ultrasound; continuous regime; *Saccharomyces cerevisiae* inactivation.

## 1. Introduction

Non-thermal food preservation techniques, such as pulsed light (Ramos-Villarroel *et al.*, 2012; Maftai *et al.*, 2014), ozone (Patil *et al.*, 2010; Torlak, 2014), high hydrostatic pressure (Buzrul, 2014; Baptista *et al.*, 2015), pulsed electric fields (Boulaabaa *et al.*, 2014; Raso *et al.*, 2014), ultrasound (Gabriel, 2014; Khandpur and Gogate, 2016) or ultraviolet radiation (Baysal *et al.*, 2013; Gabriel *et al.*, 2015) have been developed in response to an increasing consumer demand for natural, fresh food which is free from chemical preservatives. These non-thermal technologies have demonstrated their capacity to preserve nutrients and functionality in food, extending its shelf-life and minimizing the changes in natural color, taste, flavor and texture. One of these technologies, supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) processing, has been applied in the inactivation of enzymes and both pathogen and spoilage microorganisms (Choi *et al.*, 2008). SC-CO<sub>2</sub> treatment involves food contact with SC-CO<sub>2</sub> for a certain period of time in a batch, semi-batch or continuous equipment.

SC-CO<sub>2</sub> treatments have been applied to inactivate gram-negative bacteria, such as *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli* or *Yersinia enterocolitica*, and gram-positive bacteria or yeast, such as *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* or *Saccharomyces cerevisiae* (Bermúdez- Aguirre and Corradini, 2012; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007). The studies dealing with inactivation techniques including SC-CO<sub>2</sub>, have demonstrated that gram-positive cells are more resistant than gram-negative ones owing to the fact that their cell wall is thicker (Villas-Boas *et al.*, 2006). Ortuño *et al.* (2012b, 2013) showed that when using SC-CO<sub>2</sub> under 225 bar and 36 °C, 50 min were necessary to reach a reduction of 7 log-cycles of *E. coli*, compared to the 150 min needed to reach a 3 log-cycle reduction for *S. cerevisiae*, under the same process conditions. These results support the connection between the wall thickness and the resistance to SC-CO<sub>2</sub> inactivation. In addition to the wall thickness, the cell wall composition and the expression of stress-response genes, such as the heat shock proteins, are factors that determine the resistance of microorganisms to the process conditions (Ortuño *et al.*, 2012a).

Most of the studies found in the literature use batch SC-CO<sub>2</sub> systems to inactivate microorganisms in liquid media. In order to obtain the required lethality after shorter processing times or when using a lower treatment intensity and to accelerate the CO<sub>2</sub> inactivation mechanisms in batch systems, previous studies analyzed the advantages of coupling SC-CO<sub>2</sub> with high power ultrasound (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) for microbial

inactivation purposes (Ortuño *et al.*, 2012b, 2013; Spilimbergo *et al.*, 2014). Ortuño *et al.* (2012b) showed that the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment drastically reduced the time required for *E. coli* inactivation in LB broth with respect to SC-CO<sub>2</sub> processing; at 225 bar and 36 °C, an inactivation of 7 log-cycles was obtained in 2 min, instead of the 50 min required using only SC-CO<sub>2</sub>. In the case of *S. cerevisiae* inoculated in YPD broth, Ortuño *et al.* (2013) showed that 7 log-cycles of inactivation were achieved after 2 min of SC-CO<sub>2</sub>-HPU at 225 bar and 36 °C while no inactivation was reached using only SC-CO<sub>2</sub>. Therefore, with this system (batch SC-CO<sub>2</sub>-HPU), an increase in the solubilization rate of SC-CO<sub>2</sub> in the liquid is produced, as well as an enhancement in the mass transfer of the SC-CO<sub>2</sub> into the microbial cells, due to the vigorous stirring produced by the ultrasonic field. Also cavitation can damage the microbial cell walls causing the loss of intracellular vital components.

In order to improve the efficiency of batch SC-CO<sub>2</sub> treatments, continuous systems have been developed. Several authors have studied the effect of continuous SC-CO<sub>2</sub> systems on the inactivation of different microorganisms (*E. coli*, *Lactobacillus plantarum*, *L. monocytogenes*, aerobic plate count, *S. enterica* serovar *Thyphimurium* and *S. cerevisiae*), using different mediums (orange juice, carrot juice, watermelon juice, coconut water, beer) (Kincal *et al.*, 2005; Gunes *et al.*, 2005; Dagan and Balaban, 2006; Damar *et al.*, 2009; Fabroni *et al.*, 2010; Zhenghui *et al.*, 2011). These authors concluded that continuous systems require much shorter inactivation times compared with batch ones, due to the improvement in the CO<sub>2</sub> mass transfer produced by the agitation, which permits both a quick saturation of CO<sub>2</sub> into the medium and the acceleration of the inactivation mechanisms. However, no references have been found in the literature combining a continuous SC-CO<sub>2</sub> system with the use of HPU.

Therefore, considering the effect of SC-CO<sub>2</sub>-HPU on the microbial inactivation and the productivity increase of the continuous regime processes, continuous regime SC-CO<sub>2</sub>-HPU laboratory equipment was designed and built. The aim of this paper was to study the effect of pressure, temperature and product residence time on yeast inactivation using the continuous flow SC-CO<sub>2</sub>-HPU system constructed for this application and to model and optimize the process operation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microbial preparation

The microbial strain used in this study was *S. cerevisiae* T73 (*S. cerevisiae*). It is a natural strain isolated from wine fermentation in Alicante (Spain) (Querol *et al.*, 1992), and it is commercialized as Lalvin T73 (Lallemand Inc., Montreal, Canada).

### 2.2. Sample preparation and growth conditions

A single colony of *S. cerevisiae* T73 was inoculated in Yeast Peptone Dextrose Broth (YPD Broth, Sigma-Aldrich, USA) and grown overnight at 30 °C, using an incubation chamber (J.P. SELECTA, Model 3000957, Barcelona, Spain) and an orbital shaker at 120 rpm (J.P. SELECTA, Rotabit Model 3000974, Barcelona, Spain). For each experiment, a subculture was prepared by inoculating 100 µL from the starter in 100 mL of sterilized medium and incubated at 30 °C for 24 h to obtain cells in the stationary phase. Growth curves were determined in advance by both plating and the measurement of absorbance at 625 nm (data not shown). The culture was inoculated in 1 L of pasteurized commercial apple juice (Apple juice, Hacendado, Spain), to a cell concentration of  $1-10 \times 10^7$  CFU/mL and then the juice was immediately subjected to the treatment.

### 2.3. Supercritical fluid processing

A continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU equipment was designed as a continuous stirred tank reactor (CSTR) in which the HPU probe was submerged in the liquid phase (product), followed by a holding tube designed to increase the contact time between the product and the SC-CO<sub>2</sub>, analog to a plug flow reactor (PFR). The plant also included a pump for the CO<sub>2</sub> and another for the juice, a separation vessel and different auxiliary elements depicted in Fig. C.2.1.

The volume of the liquid phase during the experiments in the sonication vessel was 40 mL. The holding tube, analog to a PFR, had a volume of 52 mL. The HPU system (9-12, Fig. C.2.1) has been patented (Benedito *et al.*, 2011) in conjunction with the inactivation procedure and consists of a high power piezoelectric transducer, an insulation system and a power generator unit. The transducer ( $>1$  W/cm<sup>2</sup>) was inserted inside the inactivation vessel and included two commercial ring-shaped ceramics (11,

Fig. C.2.1; 35 mm external diameter; 12.5 mm internal diameter; 5 mm thickness; resonance frequency of 30 kHz) and a sonotrode (9, Fig. C.2.1), which was specially built to concentrate the highest amount of acoustic energy on the application point. The sonotrode was powered with constant energy by the power generator unit (12, Fig. C.2.1) during the SC-CO<sub>2</sub> process.

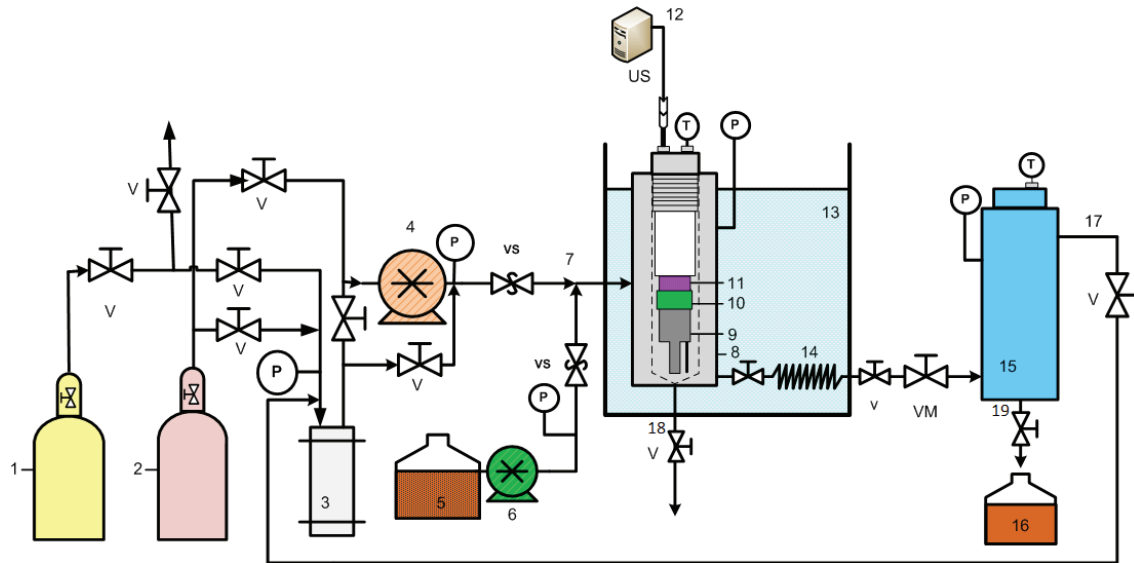
The SC-CO<sub>2</sub>-HPU process applied to the juice was as follows: first, liquid carbon dioxide was supplied from the tank to the chiller reservoir (which stores it at -18 °C) to the pump where it was compressed at the targeted pressure. For start-up, the equipment was stabilized at the treatment pressure ( $P$ ) and temperature ( $T$ ) only with SC-CO<sub>2</sub> at a constant flow rate of 5 mL/min. Thereafter, the ultrasound equipment was connected, and once the process conditions ( $P, T$ ) were fulfilled, the sample to be treated was pumped to the mixing point (7, Fig. C.2.1) where it mixed with the SC-CO<sub>2</sub>. The mixture went into the sonication vessel (8, Fig. C.2.1), where the HPU was applied. For the experiments with HPU, the power applied during the whole experiment was  $40\text{ W} \pm 5\text{ W}$  ( $I = 250 \pm 10\text{ mA}$ ;  $U = 220 \pm 5\text{ V}$ , measured with a Digital Power Meter, Yokogawa, Model WT210) and the frequency  $30.7 \pm 1.8\text{ kHz}$ . Pressure and temperature were kept constant during the experiment. The mixture of juice/SC-CO<sub>2</sub> exiting the treatment vessel went into the holding tube (14, Fig. C.2.1) and, finally, into the separation vessel (15, Fig. C.2.1). Prior to each experiment, the different sections of the equipment which the product flows through were cleaned and sanitized with disinfectant solution (Delladet VS2, Diversey, Spain), and distilled and autoclaved water. For each process condition, 3 treated juice samples (3 mL) were extracted in sterile plastic test tubes at different times (4 min time interval) through the sonication vessel output (18, Fig. C.2.1) and another 3 samples through the separation vessel output (19, Fig. C.2.1). The first sample was taken after 125 mL of juice was treated, to ensure the steady state was reached. The microbial analyses were performed on the three samples and averaged for each process condition. Sampling output tubes were cleaned and disinfected with 3 mL ethanol (96%v/v) after every sample extraction.

#### 2.4. Enumeration of viable microorganisms

The viability of *S. cerevisiae* in the samples was determined by the plate count method before and after every treatment. Samples were serially diluted and 100  $\mu\text{L}$  of the appropriate dilutions were plated on Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD Agar, Sigma-Aldrich, USA) in triplicate. The plates were incubated at 30 °C for 24 h before counting. The experimental results shown are the arithmetic mean and the standard



deviation of  $-\log(N/N_0)$  for at least three plates, where  $N_0$  is the initial number of cells in the control sample and  $N$  is the number of cells in the sample after the different treatment times.



**Fig. C.2.1.** Supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO<sub>2</sub> tank; 2. N<sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO<sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Continuous contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO<sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.

## 2.5. Experimental design

Four process variables were considered: pressure ( $P$ ), temperature ( $T$ ), juice flow ( $q$ ) and type of treatment (with or without HPU); keeping the SC-CO<sub>2</sub> flow ( $q_{CO_2}$ ) constant at 5 mL/min. Initially, the effect of juice flow and pressure was studied in a 3x3 complete factorial design at constant temperature. The product flow levels were 5, 15 and 25 mL/min and the pressures were 100, 200 and 300 bar; every treatment was carried out at a temperature of 31 °C. In order to limit the SC-CO<sub>2</sub> consumption, the ratio between the SC-CO<sub>2</sub> and juice flows was limited to 1. The effect of temperature was studied from a 3x2x2 complete factorial design. The temperatures were 31, 36, and 41 °C, the pressures 100 and 200 bar, and there were 15 and 25 mL/min of product flow. All of the treatments were carried out with and without ultrasound and were run in triplicate. Taking into account that the liquid phase volume in the sonication

vessel ( $V_{SoV}$ ) was 40 mL and the holding tube volume ( $V_{SeV}$ ) 52 mL, two residence time values were considered: the residence time in the sonication vessel ( $\tau_{SoV}$ ) and the total residence time ( $\tau_{ToT}$ ). These values were calculated using Eqs. (1) and (2).

$$\tau_{SoV} = \frac{V_{SoV}}{q + q_{CO_2}} \quad (1)$$

$$\tau_{ToT} = \frac{V_{SeV} + V_{SoV}}{q + q_{CO_2}} \quad (2)$$

Applying Eqs. (1) and (2) and considering the juice flow range (5-25 mL/min), the residence time limits resulted in  $1.333 < \tau_{SoV} < 4$  and  $3.0667 < \tau_{ToT} < 9.2$  minutes. The experimental design is described in Table C.2.1.

**Table C.2.1.**

Experimental design performed to analyze the effect of pressure, temperature, use of ultrasound, residence time in the sonication vessel ( $\tau_{SoV}$ ) and the total residence time ( $\tau_{TOT}$ ) on *S. cerevisiae* inactivation.

P (bar)	T (°C)	Juice flow (mL/min)	$\tau_{SoV}$ (min)	$\tau_{TOT}$ (min)
100	31	5	4	9.2
200	31	5	4	9.2
300	31	5	4	9.2
100	31	15	2	4.6
200	31	15	2	4.6
300	31	15	2	4.6
100	31	25	1.333	3.0667
200	31	25	1.333	3.0667
300	31	25	1.333	3.0667
100	36	15	2	4.6
200	36	15	2	4.6
100	36	15	2	4.6
200	36	15	2	4.6
100	41	25	1.333	3.0667
200	41	25	1.333	3.0667
100	41	25	1.333	3.0667
200	41	25	1.333	3.0667

All of the treatments were carried out with and without ultrasound and were run in triplicate.

2.6. Statistical modeling

A boolean-real hybrid model was assessed in order to analyze the effect of the process variables on the *S. cerevisiae* inactivation. The model was a function of the type  $f: \mathcal{A}^3 \times \mathcal{B} \rightarrow \mathcal{R}_+$  where  $\mathcal{A} = [-1,1]$ ,  $\mathcal{B} = \{0, 1\}$  and  $\mathcal{R}_+$  is the positive field of real numbers. This means that the three process variables were linearly codified as:  $x_1 = f_{11}(\tau_{sov})$  or  $x_1 = f_{11}(\tau_{TOT})$ ,  $x_2 = f_2(T)$  and  $x_3 = f_3(P)$  where  $f_1$ ,  $f_2$  and  $f_3$  are linear functions, in such a way that each combination  $(x_1, x_2, x_3) \in \mathcal{A}$ ; and a boolean variable  $x_4 \in \mathcal{B}$  is used to define the application or not of ultrasound. The codified variables were defined in Eqs. (3) – (5).

$$x_1 = \frac{\tau_{sov} - 2.667}{1.333} \in \mathcal{A} \quad \text{for the sonication vessel output} \quad (3a)$$

$$x_1 = \frac{\tau_{TOT} - 6.133}{3.033} \in \mathcal{A} \quad \text{for the separation vessel output} \quad (3b)$$

$$x_2 = \frac{T - 36}{5} \in \mathcal{A} \quad (4)$$

$$x_3 = \frac{P - 200}{100} \in \mathcal{A} \quad (5)$$

where the constant values in Eqs. (3) – (5) were calculated so that any codified variable must be in the range -1 to 1.

The boolean variable is defined as,

$$x_4 = \begin{cases} 0 & \text{for the proces without ultrasound} \\ 1 & \text{for the proces with ultrasound} \end{cases} \quad (6)$$

In order to ensure that the response was always positive, it was defined as Eq. (7).

$$y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right) \in \mathcal{R}_+ \quad (7)$$

Then, the hybrid model was defined by Eq. (8).

$$\begin{aligned}
 y = & (\beta_0 + \gamma_0 x_4) + (\beta_1 + \gamma_1 x_4)x_1 + (\beta_2 + \gamma_2 x_4)x_2 + (\beta_3 + \gamma_3 x_4)x_3 + (\beta_{11} + \gamma_{11} x_4)x_1^2 \\
 & + (\beta_{12} + \gamma_{12} x_4)x_1 x_2 + (\beta_{13} + \gamma_{13} x_4)x_1 x_3 + (\beta_{22} + \gamma_{22} x_4)x_2^2 \\
 & + (\beta_{23} + \gamma_{23} x_4)x_2 x_3 + (\beta_{33} + \gamma_{33} x_4)x_3^2
 \end{aligned} \tag{8}$$

With the hybrid model proposed it is possible to perform a statistical evaluation of the effect of HPU through the significance of the  $\gamma$  parameters (Neter & Wasserman, 1978).

The same model was fit separately to the two sets of experimental results: the inactivation data for the sonication vessel outlet ( $x_1$  defined in Eq. (3a)) and for the separation vessel outlet ( $x_1$  defined in Eq. (3b)).

### 3. Results and Discussion

The continuous flow SC-CO<sub>2</sub>-HPU equipment was used for the evaluation of the effect of pressure, temperature and residence time on *S. cerevisiae* inactivation, for the experimental design and under the conditions described in sections 2.1-2.5. The effect of the process variables on inactivation was quantified through Eq. (8) parameters. The value of the parameters obtained for the two sets of experimental results (samples extracted in the sonication vessel and in the separator) and their statistical significance are listed in Table C.2.2. The fitted model had a determination coefficient ( $r^2$ ) of 0.92 for the sonication vessel and 0.88 for the separator and an estimated variance ( $s^2$ ) of 0.418 and 0.364 for the sonication and separator vessels, respectively. The general behavior of the model with respect to residence time, pressure and operation mode (with and without HPU) is plotted in Figs. C.2.2 and C.2.3, and the individual effects of the process variables on the microbial inactivation are plotted in Figs. C.2.4-C.2.6.

**Table C.2. 2.**

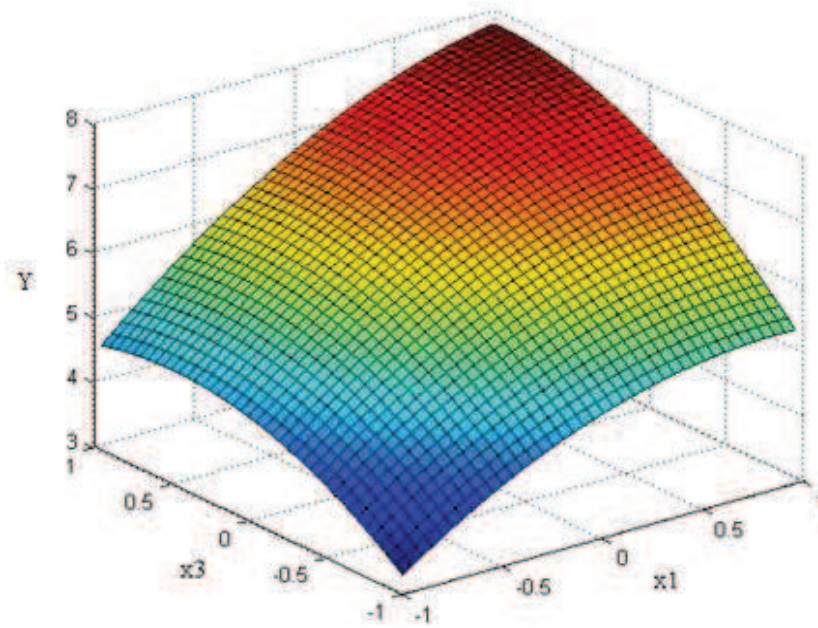
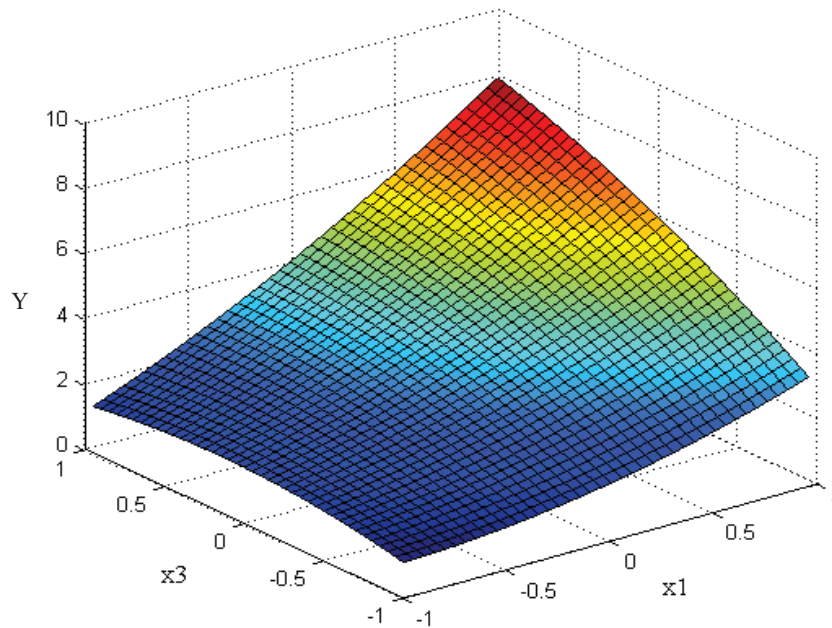
Parameters of the model (Equation (8)) used to describe the effect of pressure, temperature, residence time and use of ultrasound on the inactivation of *S. cerevisiae* using SC-CO<sub>2</sub>-HPU.

Parameter	Sonication vessel	p	Separator vessel	p
$\beta_0$	3.891	<0.01	8.29	<0.01
$\beta_1$	2.956	<0.01	3.744	<0.01
$\beta_2$	0.409	0.12	1.703	<0.01
$\beta_3$	0.916	<0.01	-0.2011	0.24
$\beta_{11}$	0.499	<0.01	-0.183	<0.01
$\beta_{12}$	0.622	0.05	1.582	<0.01
$\beta_{13}$	1.155	<0.01	-0.423	<0.01
$\beta_{22}$	0.069	0.67	-0.471	<0.01
$\beta_{23}$	-0.373	0.02	-0.972	<0.01
$\beta_{33}$	-0.484	<0.01	-0.621	<0.01
$\gamma_0$	3.24	<0.01	-0.964	<0.01
$\gamma_1$	-1.757	<0.01	-2.755	<0.01
$\gamma_2$	-0.131	0.74	-1.012	0.01
$\gamma_3$	-0.326	0.19	0.508	<0.01
$\gamma_{11}$	-1.09	<0.01	0.263	0.37
$\gamma_{12}$	-0.77	<0.01	-1.69	<0.01
$\gamma_{13}$	-0.844	<0.01	0.395	0.02
$\gamma_{22}$	-0.3825	<0.01	0.170	0.46
$\gamma_{23}$	0.0119	0.95	0.980	<0.01
$\gamma_{33}$	-0.1818	0.42	0.633	<0.01

p: probability that the parameter could be zero and therefore non-significant in the model.

### 3.1. Effect of residence time and HPU

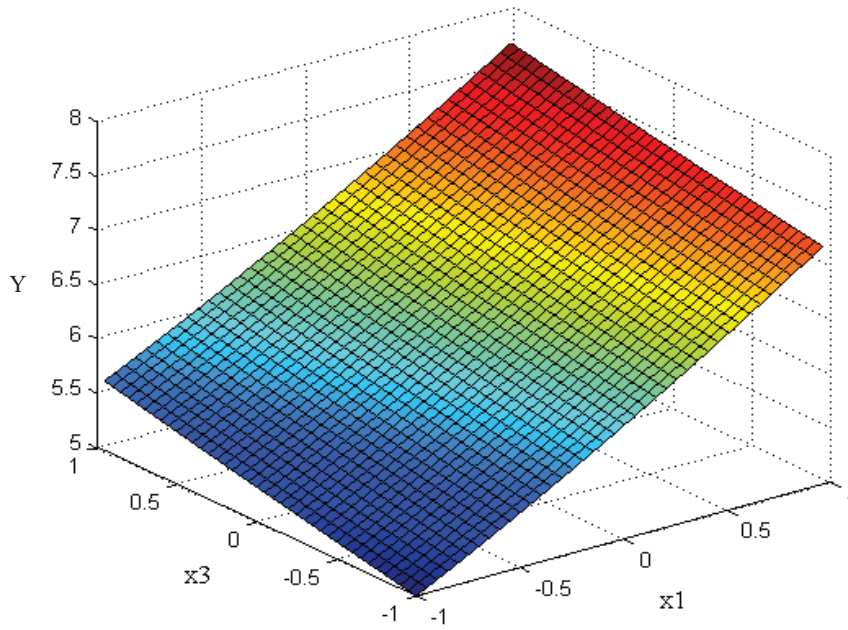
In Table 2, the significance probability of parameters  $\beta_1$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_{12}$ ,  $\gamma_{13}$  and  $\gamma_{11}$  indicates that residence time and operation mode (with and without HPU) are highly statistically significant in *S. cerevisiae* inactivation both in the sonication vessel and in the separator. The significance of second order interactions ( $\beta_{12}$ ,  $\gamma_1, \dots$ ) and third order interactions ( $\gamma_{11}, \gamma_{22}, \dots$ ), complicates the interpretation of the effects. Therefore, the graphical behavior of the model was plotted in Figs. C.2.2 and C.2.3. The model relates four process variables with one response, so, in order to be plotted in a 3D graph, it is necessary to fix two variables and plot the response as a function of the remaining two process variables. Fig. C.2.2 plots the model behavior in the sonication vessel at a fixed temperature of 31 °C ( $x_2 = -1$ ) and for the two possibilities of the boolean variable: without ultrasound ( $x_4 = 0$ ) and with ultrasound ( $x_4 = 1$ ). Fig. C.2.3 shows the same information for the separator. Figs. C.2.4-C.2.6 show Eq. (8) behavior in 2D projections and compare the fitted behavior with the experimental results under several process conditions. Fig. C.2.4 plots Eq. (8) at a constant pressure and temperature (300 bar and 31 °C), whereas Eq. (8) at a constant pressure and flow is plotted in Figs. C.2.5 (100 bar and 15 mL/min) and 6 (200 bar and 15 mL/min).

**a****b**

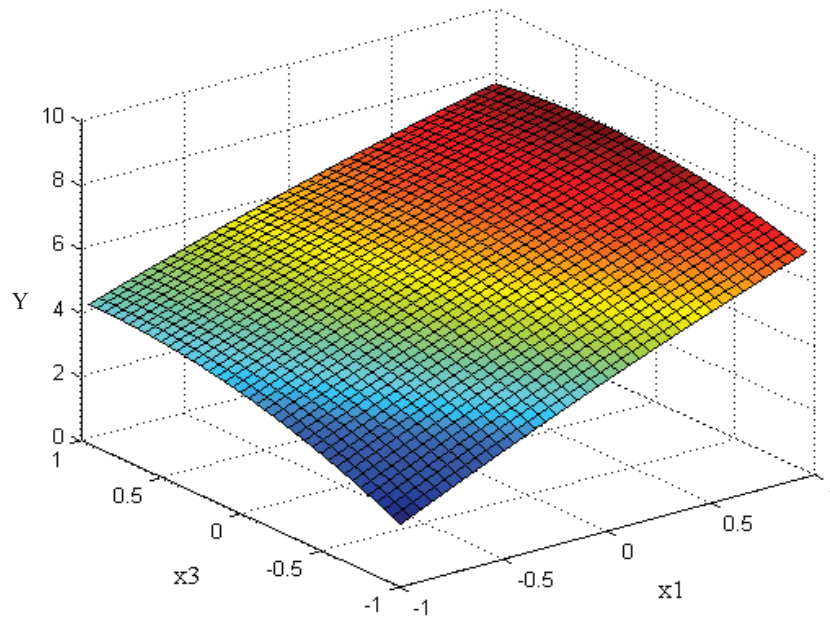
**Fig.C.2.2.** Modeled (Eq. (8)) *S. cerevisiae* inactivation ( $y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$ ) using a HPU

assisted supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system at 31 °C in sonication vessel. Effect of juice flow ( $x_1$ ) and pressure ( $x_3$ ). a) with ultrasound; b) without ultrasound.





a



b

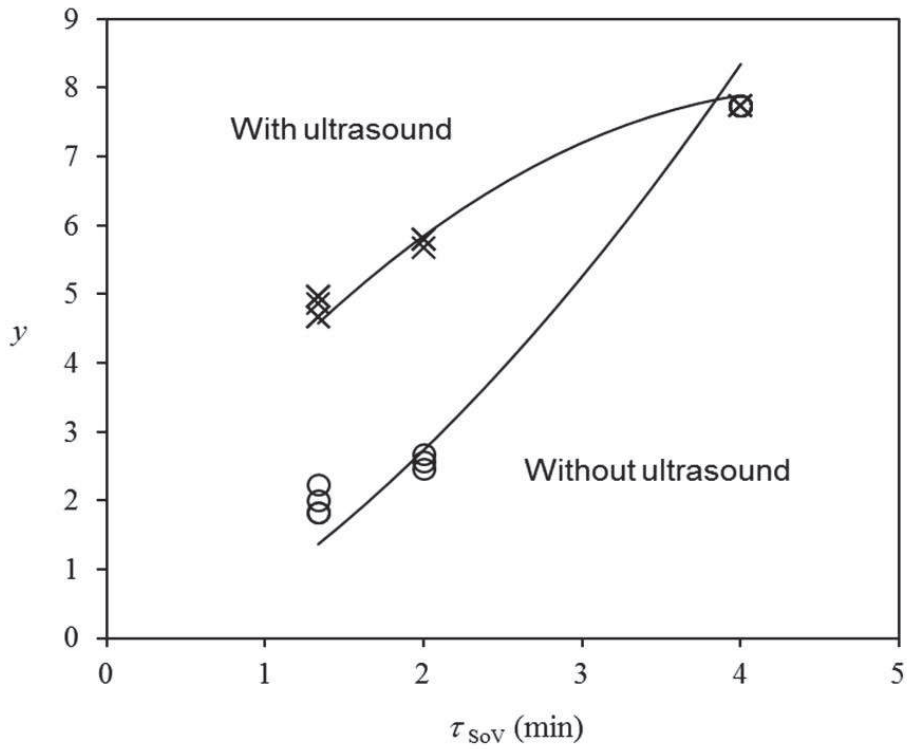
**Fig.C.2.3.** Modeled (Eq. (8)) *S. cerevisiae* inactivation ( $y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$ ) using a HPU assisted supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system at 31 °C in separator. Effect of juice flow ( $x_1$ ) and pressure ( $x_3$ ). a) with ultrasound; b) without ultrasound.

From Fig. C.2.2 and C.2.3 the  $\gamma_1$ ,  $\gamma_{12}$ ,  $\gamma_{13}$ ,  $\gamma_{11}$  values and their significance, it can be concluded that there is a significant effect ( $p < 0.01$ ) of HPU on microbial inactivation. In particular, compared to treatments without US, HPU increases the inactivation of *S. cerevisiae* in the sonication and separation vessels by an average of 1.5 log-cycles and 2 log-cycles, respectively. The effect of HPU may be attributed to the enhancement of CO<sub>2</sub> mass transfer into the juice that accelerates the pH decrease in the liquid phase and the extraction of components such as phospholipids and hydrophobic compounds, from *S. cerevisiae* cells. Another possible mechanism is the cavitation produced by HPU in the liquid phase (Gogate *et al.*, 2011). Cavitation refers to the formation, growth, and implosion of tiny bubbles of CO<sub>2</sub> or water vapor in a liquid when ultrasounds travels through it. Cavitation has been proven to cause cracked or damaged cell walls, which enhances the penetration of SC-CO<sub>2</sub> inside the cells, changing the cellular equilibrium and facilitating the extraction of intracellular compounds, thus accelerating the death of the microbial cells. Ortuño *et al.* (2014) observed that after the SC-CO<sub>2</sub> - HPU treatment, the cell wall and cell membrane were totally disrupted, thus easing the disintegration of the cytoplasm and the inactivation of cells. The damage caused by the treatment was serious enough to prevent a possible regrowth of cells. Another effect of HPU is the increase in the internal cell component mass transfer and interfacial turbulence, accelerating the inactivation effect of CO<sub>2</sub> (Gao *et al.*, 2009).

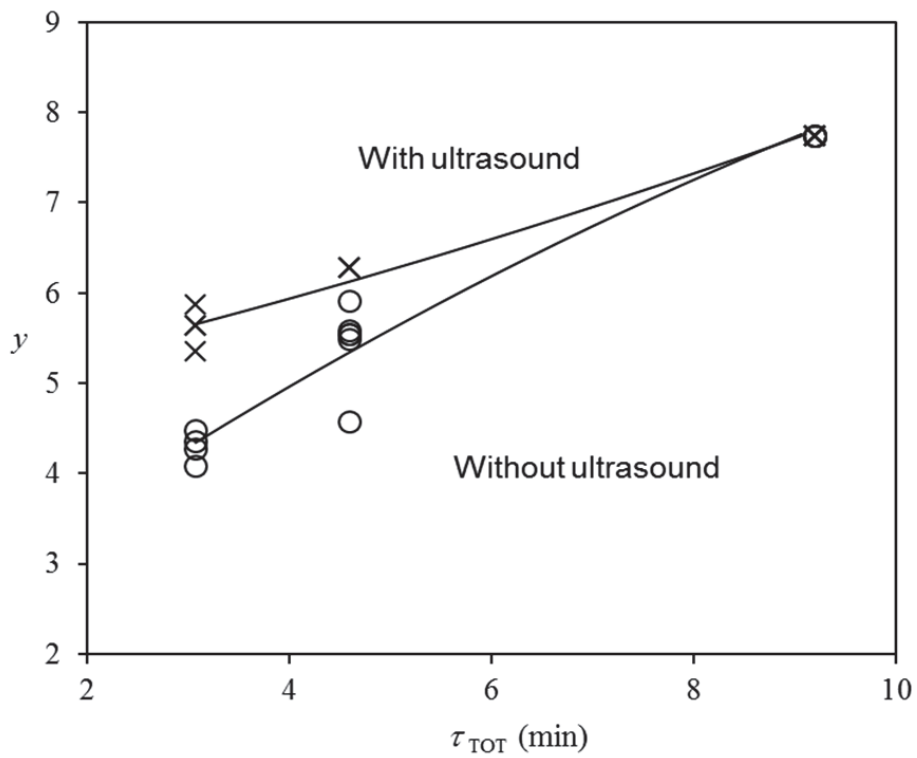
Table C.2.2  $\beta_0$  value parameters and their significance indicate that there exists a maximum inactivation difference of 4 log-cycles in the separator with respect to the reactor. This difference shows that, although some inactivation is obtained in the sonication vessel, the holding tube as analog of a PFR complements the inactivation, providing enough contact time between the SC-CO<sub>2</sub> and the microbial cells for the microbial inactivation to be completed. In this regard, the SC-CO<sub>2</sub> dissolved into the juice in the holding tube penetrates the damaged cells and completes the inactivation mechanisms, leading to the maximum microbial death.

Figs. C.2.4a and b show that, regardless of the use of HPU, inactivation increases at the longest residence times. The effect of ultrasound is dependent on the total residence time. At the shortest residence times, the HPU intensification can be clearly observed (Figs. C.2.4a and b) and greater inactivation levels are obtained compared with treatments which only use SC-CO<sub>2</sub>. For example, at 9.2 min an inactivation of around 8 log-cycles of *S. cerevisiae* was obtained regardless of whether HPU was

used or not; however, at 3.06 min, 4.2 log-cycles were obtained without HPU and 5 log-cycles with HPU (Fig. C.2.4b). The results relating the microbial inactivation to the residence time in the sonication vessel (Fig. C.2.3a) are consistent with Ortuño *et al.* (2013). These authors reported an average inactivation of 5 log-cycles of *S. cerevisiae* (in YPD Broth) in 1.3 min and 7 log-cycles in 2 min, for a SC-CO<sub>2</sub>-HPU batch treatment at different pressures (100, 225, 290 and 350 bar) and temperatures (31, 36 and 41 °C). However, using a batch SC-CO<sub>2</sub> (without HPU) system, Ortuño *et al.* (2013) reported an inactivation of *S. cerevisiae* in YPD Broth of less than 1 log-cycle after 50 min of contact time at 225 bar and 31-41 °C. Therefore, considering the inactivation obtained in the present study (8 log-cycles at 9.2 min total residence time) without HPU, the continuous SC-CO<sub>2</sub> treatment system allows a better mixing of CO<sub>2</sub> in the juice and hence a greater dissolution and penetration into the microbial cells due to the fluid flow compared with batch treatments (Gunes *et al.*, 2005; Shimoda *et al.*, 1998).



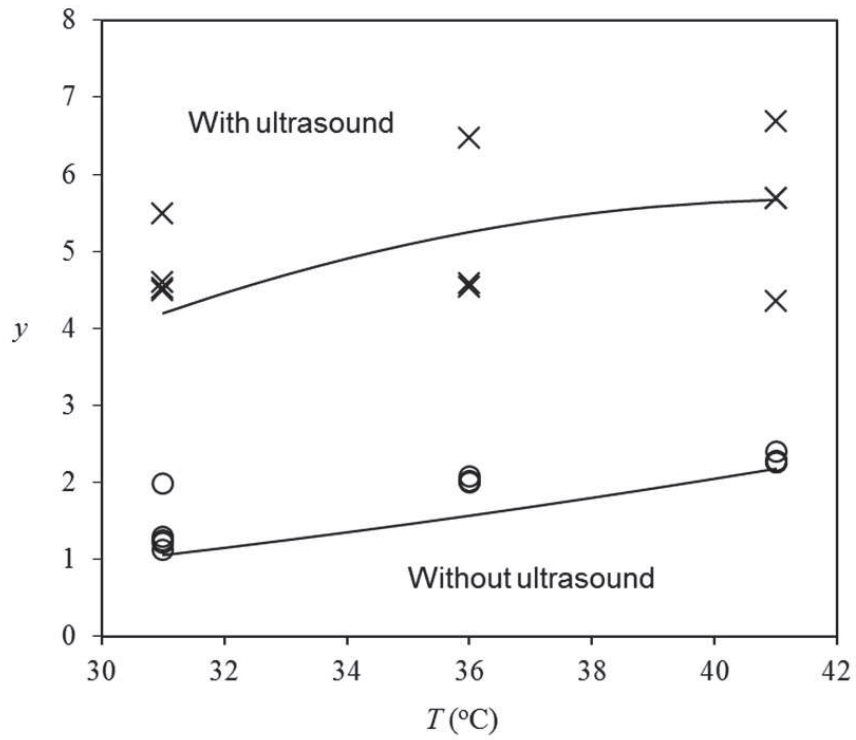
a



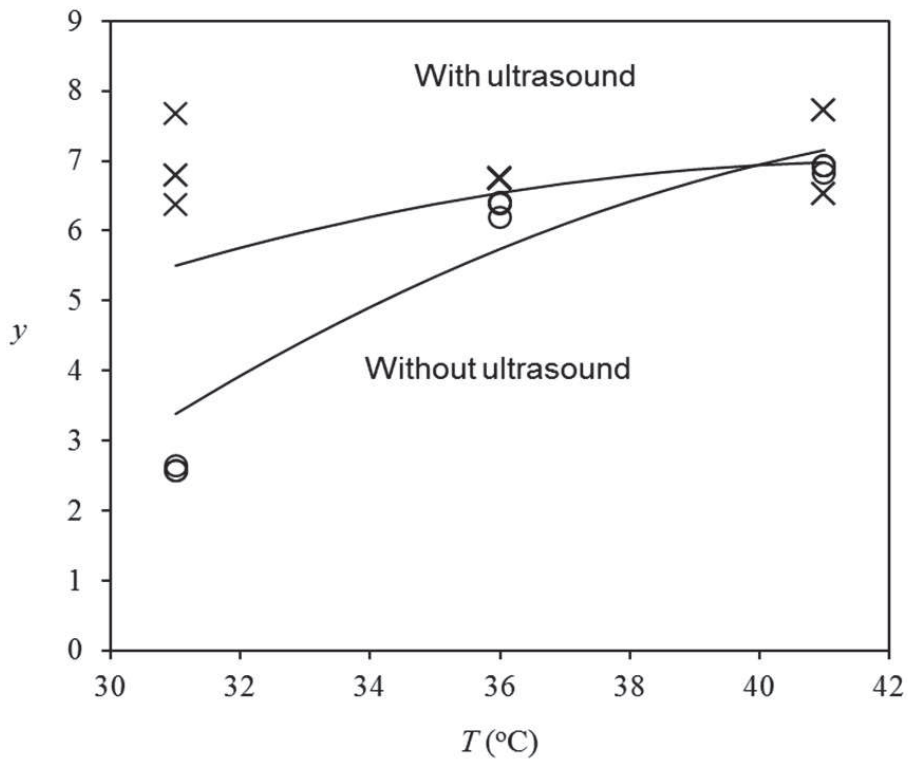
b

**Fig. C.2.4.** Effect of juice residence time on *S. cerevisiae* inactivation ( $y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$ )

at 300 bar and 31 °C. Experimental data: SC-CO<sub>2</sub> (O) and SC-CO<sub>2</sub>-HPU (x). Modeled (Eq. (8); continuous line). a) Sonication vessel; b) separator.



a



b

**Fig. C.2.5.** Effect of temperature on *S. cerevisiae* inactivation ( $y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$ ) at 100 bar and 15 mL/min (4.6 min residence time). Experimental data: SC-CO<sub>2</sub> (O) and SC-CO<sub>2</sub>-HPU (x). Modeled (Eq. (8); continuous line). a) Sonication vessel; b) separator

### 3.2. Effect of pressure

The significance probability of Table C.2.2  $\beta_3$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{33}$  and  $\gamma_{13}$  parameters indicates that pressure and its interaction with the operation mode are statistically significant as regards *S. cerevisiae* inactivation both in the sonication vessel and the separator. The generalized behavior of the pressure effect can be appreciated in Figs. C.2.2 and C.2.3. It can be observed that the pressure effect is dependent on the other process variables. For example, the pressure effect is almost negligible at 1.33 min residence time ( $x_1 = -1$ ) without ultrasound in the sonication vessel (Fig. C.2.2b); and reaches a maximum, with a difference of 4.3 log-cycles of inactivation between 300 and 100 bars, at 4 min ( $x_1 = 1$ ) without HPU in the sonication vessel (Fig C.2.2b).

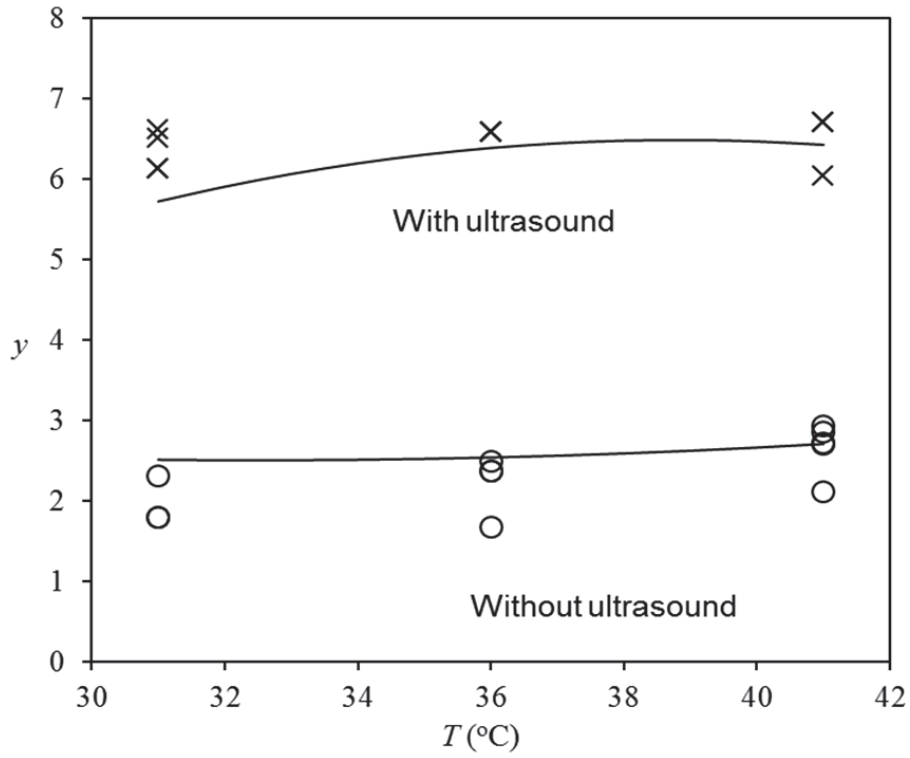
Several authors have previously studied *S. cerevisiae* inactivation. Spilimbergo and Mantoan (2005) and Erkmen (2003) concluded that the pressure increase had a positive effect on the inactivation treatment. CO<sub>2</sub> can diffuse into the cellular membrane and accumulate within the cells, since the plasmic membrane of a microbial cell consists of a lipid bilayer structure. At higher pressures, the amount of dissolved CO<sub>2</sub> increases and, therefore, a large number of CO<sub>2</sub> molecules can cross through the cell membrane and lower the internal pH enough to exceed the buffering capacity of the cytoplasmic content. The lowering of pH inside the cells might cause the inhibition and/or inactivation of key enzymes essential for metabolic and regulating processes, such as glycolysis, amino acids and peptide transport, the active transport of ions and proton translocation (Spilimbergo and Bertuccio, 2003).

### 3.3. Effect of temperature

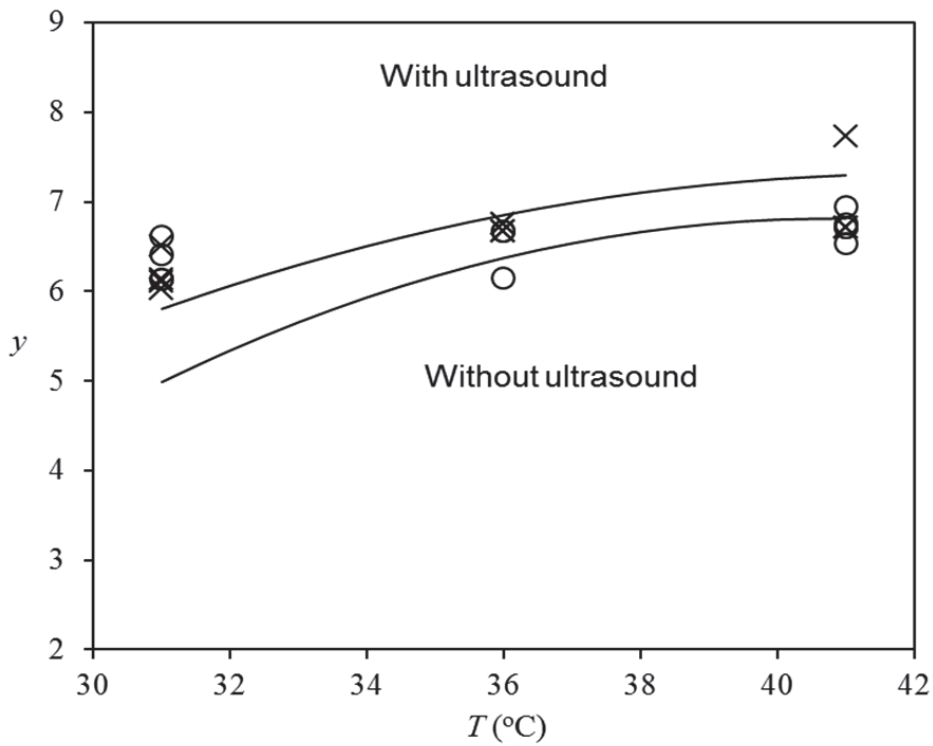
The significance of Table 2  $\beta_{12}$  and  $\beta_{23}$  parameters for the sonication vessel indicates that temperature has a significant effect on *S. cerevisiae* inactivation. However, no interaction was found between temperature and the use of HPU in the sonication vessel, which can be observed in Figs.C.2.4a and C.2.6a, where, although the application of HPU increases the inactivation by 3.7 log-cycles (quantified in  $\gamma_0$  parameter), the slopes of both model lines are almost the same. On the contrary, in the separator, the significance of  $\beta_2$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\gamma_{12}$  and  $\gamma_{23}$  parameters indicates as regards *S. cerevisiae* inactivation, as can be observed in Fig. C.2.5b. For example,

at 100 bar and 4.6 min of total residence time with ultrasound, in the separator vessel, a maximum inactivation difference of 1 log-cycle can be obtained at the highest temperature used (41 °C) with respect to the lowest one (31 °C), which indicates that the effect of temperature, although significant, is moderate.

Ortuño *et al.* (2013) studied the influence of HPU on *S. cerevisiae* inactivation kinetics using a batch SC-CO<sub>2</sub> system. These authors found a similar, moderate effect of temperatures between 31 and 41 °C on the microbial inactivation. The temperature effect is explained by the decrease in the medium's viscosity at higher temperatures, which causes an increase in the SC-CO<sub>2</sub> diffusivity, facilitating the penetration of SC-CO<sub>2</sub> into the cells and causing the extraction of essential substances from cells or membranes, cytoplasmic membranes and disorders in the organelles, and therefore, the disruption of the biological system in the cell (Shimoda *et al.*, 1998).



a



b

**Fig.C.2.6.** Effect of temperature on *S. cerevisiae* in activation ( $y = -\log\left(\frac{N}{N_0}\right)$ ) at 200 bar and 15mL/min (4.6 min residence time). Experimental data: SC-CO<sub>2</sub> (O) and SC-CO<sub>2</sub>-HPU (x). Modeled (Eq. (8); continuous line). a) Sonication vessel; b) separator.



### 3.4. Process optimization

As can be observed in the significance of the second and third order interaction parameters (Table C.2.2), it is evident that the effect of process variables has strong interactions. However, the fitted descriptive model (Eq. (8)) can be used to find the maximum potential of the proposed process. In order to increase the process productivity, the maximum potential of the process would be given by the minimum residence time that could be handled (maximum product flow), ensuring the desired number of log-cycles reduction. For the sonication vessel, Eq. (8) was considered for the optimization in order to show the actual potential of HPU however, the inactivation level reached in the separator was also calculated. Accordingly, a multi-objective optimization problem of two competitive variables (residence time vs microbial reduction) was formulated. The problem, solved as detailed in Carrillo-Ahumada *et al.* (2011), was formulated as follows:

Problem 1,

$$\begin{aligned} & \text{Min } \tau_{SoV} \\ & \text{Subject to } y_{SoV} \geq \phi \\ & \text{and } 1.333 < \tau_{SoV} < 4, 31 < T < 41, 100 < P < 300, 0 < x_4 < 1 \end{aligned}$$

Where  $\phi$  is the required number of log-cycles reduction. The optimization problem was solved, applying the Box-Ruiz-Rodríguez-García constraint optimization algorithm (Ruiz-López *et al.*, 2006), at different values of  $\phi$  in order to obtain the maximum flows that could be achieved for microbial reductions ranging from 5 to 7 log-cycles. The optimum results are listed in Table C.2.3 with superscript 1, 2 and 3. The results indicate that when optimization problem 1 was solved for  $\phi = 5$ , the competitive behavior between residence time vs microbial reduction was lost. This can be observed by the fact that the optimum was found in  $y = 5.5$ . Therefore, the maximum inactivation that can be obtained at 1.35 min or less of sonication vessel residence time, was sought by the following optimization problem,

Problem 2,

$$\text{Max } f(\tau_{SoV}, T, P, x_4)$$

$$\text{Subject to } 1.33 < \tau_{SoV} < 1.35, 31 < T < 41, 100 < P < 300, 0 < x_4 < 1$$

The result of optimization problem 2 is listed in Table C.2.3 with superscript 4. The microbial reduction obtained in the sonication vessel at optimum  $\tau_{SoV}$ ,  $T$  and  $P$  for problems 1 and 2, but with  $x_4 = 0$  (without HPU), is also listed in Table C.2.3. The effect of HPU in the sonication vessel is clearly evident from the inactivation differences of 3.8, 4.1, and 4.2 log-cycles when HPU is used and when it is not (Table C.2.3). The different inactivation parameters predicted by the optimization problems in the sonication vessel were used to calculate the inactivation in the separator (Table C.2.3). As expected, an increase of inactivation (avg. 1 log-cycles with HPU and 3.3 without HPU) with respect to the sonication vessel is obtained due to the longer residence time provided by the holding tube. The HPU effect in the separator vessel can be appreciated by the fact that, for the problem 2 optimum (subscript 4), there is a difference of 2.5 log cycles reduction when HPU is used and when not. The model developed was used to find the optimum working conditions by maximizing the flow; however, it could also be used for minimizing the process temperatures to increase the product quality.

**Table C.2.3.**

Optimization results in the sonication ( $y_{SoV}$ ) and separation vessels ( $y_{SeV}$ ), calculated to minimize the residence time (problem 1) and to maximize the microbial inactivation (problem 2).

$\tau_{SoV}$ (min)	$q$ (mL/min)	$\tau_{TOT}$ (min)	$T$ (°C)	$P$ (bar)	$x_4$	$y_{SoV}$	$y_{SeV}$
2.40	11.7	5.52	37.6	231.1	1	7.0 <sup>1</sup>	7.4
2.40	11.7	5.52	37.6	231.1	0	3.5	7.4
1.66	19.1	3.82	37.4	219.3	1	6.0 <sup>2</sup>	6.9
1.66	19.1	3.82	37.4	219.3	0	1.9	5.4
1.35	24.6	3.10	39.0	216.7	1	5.5 <sup>3</sup>	6.9
1.35	24.6	3.10	39.0	216.7	0	1.3	4.2
1.35	24.6	3.10	39.4	203.4	1	5.5 <sup>4</sup>	6.8
1.35	24.6	3.10	39.4	203.4	0	1.3	4.3

Superscript 1-3: Optimization results obtained after minimizing the residence time and ensuring a given microbial inactivation ( $\phi$ ), 1:  $\phi \geq 7$ ; 2:  $\phi \geq 6$ ; 3:  $\phi \geq 5$ . Superscript 4: Optimization results obtained after maximizing the microbial inactivation constrained by  $1.33 < \tau_{SoV} < 1.35$  as constriction. For all the operating conditions that optimize the criteria (Superscript 1-4) in the row below, the corresponding inactivation without HPU ( $x_4 = 0$ ) is calculated

#### 4. Conclusions

The designed and built continuous regime SC-CO<sub>2</sub>-HPU plant demonstrated a high capacity to inactivate (>7 log-cycles) *S. cerevisiae* in apple juice. The results allowed the quantification of the effect of the process variables through the development of a hybrid real-boolean model that described the effect of real variables (residence time, temperature and pressure) and the discrete variable (application or not of HPU). Multi-objective optimal problems were developed in order to calculate the minimum residence time that can be handled to reach different minimum inactivation levels. The optimization results showed that the system can achieve an inactivation of 6.8 log-cycles in 3.1 min of total residence time when HPU was applied, instead of 4.3 log-cycles (under the same conditions) without HPU, which shows how important the influence of HPU is on SC-CO<sub>2</sub> inactivation.

## 5. Acknowledgments

This work was supported by the PROMETEOII\2014\005 project financed by the Generalitat Valenciana (Conselleria d'Educació, Cultura i Esport, Valencia, Spain). The authors acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship awarded to PhD Student Paniagua-Martínez, I. The authors especially wish to thank Eng. Ramón Peña for his technical assistance in the development of the equipment.

## 6. References

- Baptista, I., Queiros, R.P., Cunha, A., Rocha, S.M., Saraiva, J.A., Almeida A. (2015). Evaluation of resistance development and viability recovery by toxigenic and non-toxigenic *Staphylococcus aureus* strains after repeated cycles of high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 46, 515-520.
- Baysal, A.H., Molva, C., Unluturk, C. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 166 (3), 494–498.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G. (2012). Inactivation kinetics of *Salmonella spp.* under thermal and emerging treatments: A review. *Food Research International*, 45(2), 700–712.
- Benedito, J., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Ortuño, C., Peña, R. (2011). Procedure of inactivation microorganisms by combination of supercritical fluids and ultrasound. Spain. Patent No. P201131099.
- Boulaabaa, A., Kiesslingb, M., Töpflb, S., Heinzb, V., Kleina, G. (2014). Effect of pulsed electric fields on microbial inactivation and gelling properties of porcine blood plasma. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 23, 87–93.
- Buzrul, S. (2014). Multi-pulsed high hydrostatic pressure inactivation of microorganisms: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 1–11.
- Carrillo-Ahumada, J., Rodriguez-Jimenes, G.C., García-Alvarado, M.A. (2011). Tuning optimal-robust linear MIMO controllers of chemical reactors by using Pareto optimality. *Chemical Engineering Journal*, 174 (1), 357-367.
- Choi, Y.M., Bae, Y.Y., Kim, K.H., Kim, B.C., Rhee, M.S. (2008). Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic *E. coli*, *Listeria monocytogenes*,

- Salmonella typhimurium*, and *E. coli* O157:H7 in marinades and marinated pork. *Meat Science*, 82, 419-424.
- Dagan, G.F., Balaban, M. (2006). Pasteurization of beer by continuous dense-phase CO<sub>2</sub> system. *Journal of Food Science*, 71, E164-E169.
- Damar, S., Balaban, M., Sims, C. (2009). Continuous dense-phase CO<sub>2</sub> processing of coconut water beverage. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 666-673.
- Erkmen, O. (2003). Mathematical modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inactivation under high-pressure carbon dioxide. *Nahrung/Food*, 47 (33), 176-180.
- Fabroni, S., Amenta, M., Timpanaro, N., Rapisarda, P. (2010). Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 477-484.
- Gabriel, A.A. (2014). Inactivation behaviors of foodborne microorganisms in multi-frequency power ultrasound-treated orange juice. *Food Control* 46, 189-196.
- Gabriel, A.A., Aguila, M.L.C., Tupe, K.A.M. (2015). Application of ultraviolet-C radiation to inactivate acid-and-desiccation stressed *Salmonella enterica* in young and mature coconut liquid endosperm mix beverage. *Food Control*, 51, 425–432.
- Gao, Y., Nagy, B., Liu, X., Simandi, B., Wang, Q. (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhancement by ultrasound. *Journal of Supercritical Fluids*, 49 (3), 345-350.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.
- Gogate, P.R., Sutkar, V.S., Pandit, A.B. (2011). Sonochemical reactors: important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. *Chemical Engineering Journal*, 166, 1066-1082.
- Gunes, G., Blum, L.K., Hotchkiss, J.H. (2005). Inactivation of yeasts in grape juice using a continuous dense phase carbon dioxide processing system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2362-2368.
- Khandpur, P., Gogate, P.R. (2016). Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*. 29, 337-353.
- Kincal, D., Hill, W., Balaban, M., Portier, K., Wei, C., Marshall, M. (2005). A continuous high pressure carbon dioxide system for microbial reduction in orange juice. *Journal of Food Science*, 70, M249-M254.

- Maftai, N.A., Ramos-Villarroel, A.I., Nicolau, A.I., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2014). Influence of processing parameters on the pulsed-light inactivation of *Penicillium expansum* in apple juice. *Food Control*, 41, 27–31.
- Neter, J., Wasserman, W. (1978). In: Richard, D. (Ed.), *Applied Linear Statistical Models*. Irwin, Inc, Homewood, IL.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M., Mulet, A., Benedito, J. (2012a). Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *Journal of Supercritical Fluids*. 63, 8-15.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M., Mulet, A., Benedito, J. (2012b). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15, 31-37.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., Benedito, J. (2013). Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51, 474-481.
- Ortuño, C., Quiles, A., Benedito, J. (2014). Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 62, 955–964.
- Patil, S., Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Frias, J., Bourke, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. *Food Microbiology*, 27 (6), 835–840.
- Querol, A., Barrio, E., Ramon, D.M. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 439-446.
- Ramos-Villarroel, A.Y., Aron-Mafteib, N., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2012). The role of pulsed light spectral distribution in the inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on fresh-cut mushrooms. *Food Control*, 24 (1–2), 206–213.
- Raso, J., Condón, S., Álvarez, I. (2014). NON-THERMAL PROCESSING | Pulsed Electric Field. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 966–973.
- Ruiz-López, I.I., Rodríguez-Jimenes, G.C., García-Alvarado, M.A. (2006). Robust MIMO PID controllers tuning based on complex/real ratio of the characteristic matrix eigenvalues. *Chemical Engineering Science*, 61 (13), 4332-4340.
- Shimoda, M., Yamamoto, Y., Cocunubo-Castellanos, J., Tonoike, H., Kawano, T., Ishikawa, H., Osajima, Y. (1998). Antimicrobial effects of pressured carbon dioxide in continuous flow system. *Journal of Food Science*, 63, 709-712.
- Spilimbergo, S., Mantoan, D. (2005). Stochastic Modeling of *S. cerevisiae* Inactivation by Supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Prog*, 21, 1461-1465.

- Spilimbergo, S., Bertucco, A. (2003). Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and bioengineering*, 84, 627-638.
- Spilimbergo, S., Cappelletti, M., Ferrentino, G. (2014). High pressure carbon dioxide combined with high power ultrasound processing of dry cured ham spiked with *Listeria monocytogenes*. *Food Research International*, 66, 264-273.
- Torlak, E. (2014). Efficacy of ozone against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 1–4.
- Villas-Boas, S.G., Nielsen, J., Smedsgaard, J., Hansen, M., Roessner-Tunali, U. (2006). Sampling and sample preparation. Structures of the cell envelope: The main barrier to be broken. In Wiley&Sons (Ed.), *Metabolome analysis: An introduction* Wiley-Interscience, New York, pp. 52–58.
- Zenghui, X., Zhang, L., Wang, Y., Bi, X., Buckow, R., Xiaojun, L. (2011). Effects of high pressure CO<sub>2</sub> treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of Apple juice. *Journal of Food Engineering*, 109, 577-584.

# CHAPTER 3

---

**INACTIVATION OF THE MICROBIOTA AND EFFECT ON THE QUALITY ATTRIBUTES OF ORANGE JUICE USING A CONTINUOUS FLOW ULTRASOUND-ASSISTED SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> SYSTEM**

**INACTIVACIÓN DE LA MICROBIOTA Y EFECTO SOBRE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD DEL ZUMO DE NARANJA TRATADO EN UN SISTEMA EN CONTINUO DE CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO ASISTIDO CON ULTRASONIDOS**

Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M.A.,

Benedito, J.

*Innovative Food Science and Emerging Technologies*

*(In progress)*



## **Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of orange juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system**

Paniagua-Martínez, I.<sup>1,2</sup>, Mulet, A.<sup>1</sup>, García-Alvarado, M.A.<sup>2</sup> Benedito, J.\*<sup>1</sup>

1: Food Technology Department. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, Valencia, Spain.

2: Chemical and Biochemical Engineering Department. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel A. de Quevedo 2779. Veracruz, Mexico.

### **Abstract**

The feasibility of using supercritical CO<sub>2</sub> assisted by ultrasound (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) in continuous mode for the non-thermal pasteurization of orange juice was evaluated. The proposed technology was effective for microbial inactivation; the effectiveness was dependent on the microbial wall thickness. Results showed that the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment brought about small changes in pH, °Brix and titrable acidity of the juice. Furthermore, although SC-CO<sub>2</sub>-HPU technology provided a higher browning index (211%) and greater changes in color, it was possible to improve the cloud of juice by 173%, and also the reduction of phenolic compounds (6.5%) and ascorbic acid (5.5%) was lower compared to the thermally pasteurized juice (10 % decrease for both parameters). Moreover, the antioxidant capacity could be increased (12%) with respect to the natural juice. Therefore, SC-CO<sub>2</sub>-HPU technology is effective for microbial pasteurization and uses mild process conditions, which could lead to an increase in the quality of the treated juices.

### **Industrial relevance**

The demand for high quality processed foods which preserve their natural and fresh like characteristics has awakened a growing interest in non-thermal technologies. The ultrasound assisted SC-CO<sub>2</sub> continuous system is an innovative non thermal technology that could represent a development in the emerging technologies area. This technology allows obtaining high quality products by preserving their natural bioactive compound content while maintaining their fresh like organoleptic characteristics. In fact, worldwide food experts working in the academia, industry or governmental agencies foresee that non-thermal emerging technologies, will be among the most impactful novel food processing technologies for the next decade in terms of product commercialization.

**Keywords:** Non-thermal process, supercritical CO<sub>2</sub>, ultrasound, continuous regime, orange juice

### 1. Introduction

In recent years, while fresh citrus consumption has decreased in developed countries, processed fruit juices consumption has increased (Tiwari et al., 2009a). Worldwide, orange juice is a very popular product due to its high nutritional value, its bioactive components such as phenolic compounds, vitamin C and carotenoids and its sensory characteristics (Ortuño et al., 2014).

Despite its low pH, this juice needs to be processed because it has a limited stability due to microbial growth and enzyme activity, which can cause unpleasant organoleptic changes or degradation of compounds during storage (Ferrentino et al., 2009; Fabroni et al., 2010; Liu et al, 2010; Zinoviadou et al, 2015; Khandpur, & Gogate, 2016).

Although thermal pasteurization remains the most used method for the juices preservation, interest for developing alternative techniques is growing. The new techniques are expected to minimize changes in nutritional and organoleptic characteristics of food, obtaining fresher and richer juices than traditional thermal technology. Two such techniques are high hydrostatic pressure (HHP) and pulsed electric fields (PEF), which result in better quality retention and adequate shelf life; however, they can't inactivate adequately enzymes such as PME to result in a shelf-stable juice, unless they are combined with elevated temperatures. In addition, these new technologies involve high investment and operational costs, which is an important obstacle for their industrial application (Tiwari et al, 2009b; Niu et al, 2010; Vervoort et al., 2011; Ozuna et al., 2015). Currently, HHP processing consists of batch processes, which limits its use because of its low processing capacity (Damar & Balaban, 2006).

For processing of large volumes of liquid food such as orange juice, it is more desirable a continuous preservation process. This objective can be attained by applying supercritical fluids, a non-thermal preservation technique in which both CO<sub>2</sub> and the product are pumped through the system by high-pressure pumps, mixed and maintained in contact for a period of time (Fabroni et al., 2010; Paniagua et al., 2016).

Supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) has a density close to liquids, as well as gas properties like high diffusivity and low viscosity; and therefore excellent transport properties. Furthermore, these properties can be controlled by temperature and pressure changes (Calix et al., 2008; Niu et al, 2010.; Wimmer & Zarevúcka, 2010). Supercritical CO<sub>2</sub> is

considered an excellent alternative to solvents because of its non-toxic and non-flammable nature, and its relatively low critical pressure and temperature (7.36 MPa, 31.0 °C). Moreover, the SC-CO<sub>2</sub> has a lethal effect on bacteria. This effect is directly proportional to the applied pressure, time and temperature. SC-CO<sub>2</sub> acts as follows: first, solubilization occurs in the external liquid phase, causing the carbonic acid formation (which dissociates into bicarbonate and hydrogen ion); therefore, it increases cell membrane fluidity and permeability, increasing the diffusion of CO<sub>2</sub> into the cell and causing a decrease in intracellular pH. Thus, inactivation/inhibition of key cellular metabolic enzymes for microorganisms occurs. As a result, a disorder of electrolyte balance of intracellular constituents is produced and vital constituents of cells and cell membranes are extracted (Kincal et al., 2005; Garcia González et al., 2007; Fabroni et al., 2010; Ortuño et al., 2013; Paniagua et al., 2016).

Despite all the aforementioned advantages of SC-CO<sub>2</sub> inactivation, even in the continuous systems, long treatment times, and high pressures and temperatures are required to ensure safety and stability of food, which limits the efficiency of the inactivation process, compromises the food quality and increases processing cost. In this sense, there is growing interest in process intensification, with simultaneous application of different non-thermal technologies, seeking for synergistic effects. One of the techniques that synergistically improves the inactivation mechanisms of SC-CO<sub>2</sub> is the high power ultrasounds (HPU), which accelerates and improves heat and mass transfer processes (Ortuño et al., 2013, 2014; Paniagua et al., 2016).

When high power ultrasound propagates in a liquid, cavitation bubbles are generated due to pressure changes. These microbubbles collapse violently in the succeeding compression cycles of a propagated sonic wave. This results in localized high temperatures, pressures, and large shearing effects. Consequently, the intense local energy and high pressure bring about a localized pasteurization effect (without causing significant temperature increases, while reducing processing time and energy consumption) (Tiwari et al., 2008a, 2009; Abid et al., 2013). Therefore, with SC-CO<sub>2</sub>-HPU, an increase of the solubilization rate of SC-CO<sub>2</sub> in the liquid is produced, as well as an increase in mass transfer due to the vigorous stirring produced by the ultrasonic field. Thereby, quick saturation of CO<sub>2</sub> in the medium, and the intensification of the inactivation mechanisms are attained. Furthermore, cavitation and agitation produced by the HPU cause cell wall damages, increasing the SC-CO<sub>2</sub> penetration, the intracellular compounds extraction, and the death of microbial cells. In addition,

thermal, chemical and mechanical effects induced by HPU cavitation contribute to enzyme inactivation (Tiwari et al., 2008a).

Ortuño et al. (2012) reported that by using a batch-mode SC-CO<sub>2</sub> at 350 bar and 36 °C for 25 min, a reduction of 1 log-cycle of *Escherichia coli* DH1 (*E. coli*) was obtained in orange juice. However, Kincal et al. (2005) reported that a continuous SC-CO<sub>2</sub> treatment (210 bars, 34.5 °C, 10 min residence time) caused at least a 5 log-cycle reduction of pathogens (*E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*). Consequently, it can be expected that batch-mode equipment requires a much longer inactivation time compared to continuous SC-CO<sub>2</sub> systems. There are a few studies of batch-mode SC-CO<sub>2</sub> intensified using ultrasound (SC-CO<sub>2</sub>-HPU); two of them prove complete inactivation of *E.coli* and *S.cerevisiae* population in orange juice after 1.5 min (225 bar, 36 °C) and 5 min (350 bar, 36 °C) of treatment, respectively (Ortuño et al., 2012, 2013). In order to improve the efficiency of batch SC-CO<sub>2</sub> treatments, a continuous system was developed by Paniagua et al. (2016) who studied the inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice, using the continuous flow SC-CO<sub>2</sub>-HPU at different juice residence times (3.06-9.2 min), temperatures (31-41 °C) and pressures (100-300 bars). The results demonstrated that the maximum inactivation achieved by the system was 7.8 log-cycles. However there is no study in the literature covering either the use of this continuous technique (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) for other types of juices neither the effect of the process on the product quality. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment in continuous regime on both the inactivation of the microbiota and the quality attributes of orange juice.

## 2. Materials and methods

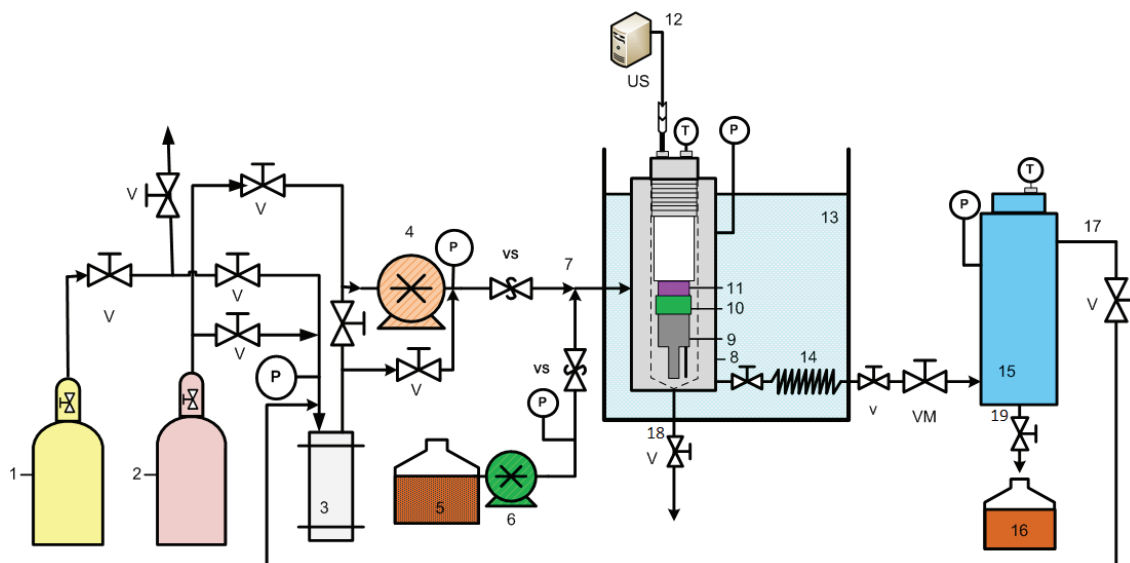
### 2.1. Orange juice

Valencia Navel oranges (*Citrus sinensis*) were purchased from a local market and kept at 4 °C for 2 days until juice extraction. Orange juice was obtained by washing, peeling and extracting the fruit juice (Ultra Juicer, Robot Coupe J80, USA). Juice extraction took place just prior to the treatment application; consequently, an extraction was required for each experiment. Each experiment required about 1.5 L of juice, 1 L was used for processing (SC-CO<sub>2</sub>-HPU and thermal pasteurization), and 0.5 L served as control.

### 2.2. SC-CO<sub>2</sub>-HPU processing

Laboratory continuous regime equipment was designed and built for supercritical CO<sub>2</sub> assisted by high power ultrasound (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) (Figure C.3.1) (Paniagua et al., 2016).

The SC-CO<sub>2</sub>-HPU process applied to the juice was as follows: first, liquid carbon dioxide was supplied from the tank to the chiller reservoir in which it was compressed to 200 bar by means of the injection of gaseous N<sub>2</sub>. The liquid CO<sub>2</sub> was supplied from the bottom of the chiller reservoir (which stores it at -18 °C) to the pump where it was compressed at the target pressure. The equipment was stabilized at the treatment pressure ( $P$ ) and temperature ( $T$ ) by flowing SC-CO<sub>2</sub> at a constant flow rate of 5 mL/min. Thereafter, the ultrasound equipment was connected, and once the process conditions ( $P, T$ ) were attained, the sample to be treated was pumped to the mixing point (7, Fig.C.3.1) where it mixed with the SC-CO<sub>2</sub>. The mixture went into the sonication vessel (8, Fig. C.3.1), where the HPU was applied. For the experiments with HPU, the power applied during the whole experiment was 40 W±5W ( $I=250 \pm 10\text{mA}$ ;  $U=220 \pm 5 \text{ V}$ , measured with a Digital Power Meter, Yokogawa, Model WT210). Pressure and temperature were kept constant during the experiment. The mixture of juice/SC-CO<sub>2</sub> exiting the sonication vessel went into the holding tube (14, Fig. C.3.1) and, finally, into the separation vessel (15, Fig. C.3.1), where it was depressurized and the CO<sub>2</sub> separated from the juice and recirculated to the reservoir (3, Fig. C.3.1). Prior to each experiment, the different sections of the equipment where the product flows through were cleaned and sanitized with disinfectant solution (Delladet VS2, Diversey, Spain) and distilled and autoclaved water. To determine the effect of temperature on the quality parameters and inactivation of the microbiota of orange juice, samples (0.5 L) were treated by SC-CO<sub>2</sub>-HPU in a continuous system at 100 bar and different temperatures (31, 36 and 41 °C). The flow rate of juice was 25 mL/min and the residence time 3.06 min. The process conditions were selected from previous experiments in order to attain adequate inactivation levels. All experiments were run in triplicate.



**Fig. C.3.1.** Supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO<sub>2</sub> tank; 2. N<sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO<sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Holding tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO<sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.

### 2.3. Heat treatment

To evaluate the effect of conventional thermal treatment on quality parameters and microbiota inactivation of orange juice, the juice was pasteurized (PASC Computer Controlled Laboratory pasteurizer, EDIBON, Spain) at 90 °C for 1 minute. For this purpose, the juice was placed in a feed tank, driven by a pump to a plate heat exchanger, rapidly heated to the desired temperature and taken to the holding tube where it remained the processing time. After the treatment time the juice was cooled rapidly in a water bath (4 °C). Thus, it was possible to compare the SC-CO<sub>2</sub>-HPU processing results (quality and microbiology) with those of conventional heat treatment.

### 2.4. Microbiota analysis

The viability of *E. coli*, total aerobic mesophilic and *S. cerevisiae* in the orange juice samples was determined by the plate count method to evaluate the effect of both treatments (SC-CO<sub>2</sub>-HPU in continuous system and thermal pasteurization) on the

microbiota of orange juice. Each sample was serially diluted with sterilized distilled water. 100  $\mu\text{L}$  of the appropriate dilution ( $10^{-1}$  and  $10^{-2}$ ) were plated in triplicate on LB Agar, PCA Agar or YPD Agar plates and incubated for 24 h at 37 °C, 35 °C or 30 °C, for *E. coli*, total aerobic mesophilic or *S. cerevisiae*, respectively, before counting. Results were expressed as  $-\log(N/N_0)$ , where  $N_0$  is the initial number of cells in the control sample and N is the number of cells in the sample after the different treatments. But in the case of total inactivation the results were expressed as  $\log(N_0)$ .

### 2.5. Physico-chemical analysis of orange juice

#### 2.5.1. pH and °BRIX

The pH of treated and untreated orange juice samples was measured using a digital pH-meter (pH Crison 25, Spain). Samples were measured in triplicate at room temperature.

Soluble solids were measured using a refractometer (Pocket Digital Refractometer Hand-held, Atago, Japan). Measurements were run in triplicate at room temperature.

#### 2.5.2. Titratable acidity

Titrate acidity was measured using the method described by Kincal et al. (2006), using NaOH 0.1 N. Results were obtained in triplicate and expressed as grams of citric acid per 100 mL of juice.

#### 2.5.3. Phenolic compounds

Total phenolic compounds were determined by the method described by Gao et al. (2000) applying 1:3 dilution factor of the samples. The quantification of the phenolic compounds with respect to a standard curve of gallic acid with concentrations between 110.4 and 552 ppm was performed. Results were expressed as ppm equivalent of gallic acid.

#### 2.5.4. Antioxidant capacity (FRAP)

Antioxidant capacity was assessed by the method described by Pulido et al. (2000) using the FRAP reagent and applying 1:20 dilution factor of the samples. To obtain the results, a calibration curve of Trolox with concentrations between 50 and 750  $\mu\text{M}$  was built, plotting the concentration of Trolox versus absorbance at 30 minutes. The



antioxidant capacity of samples at 30 minutes with FRAP reagent was expressed as equivalent Trolox concentration at 30 minutes.

### 2.5.5. Browning index

Browning index was used to know the effect of treatments on juice browning. For this purpose, a spectrophotometric method was used after centrifuging and filtering the samples. This method is described by Xu et al. (2011), although in the present work the centrifugation time was 10 minutes and the angular velocity 12600 rpm. All measurements were performed in triplicate.

### 2.5.6. Colour

Colour was measured using a colorimeter (Spectrophotometer CM-2500d, Konica Minolta, Japan) based on the L\*, a\*, b\* colour coordinates (Kincal et al., 2006; Ferrentino et al, 2009;). Colour measurements were carried out in triplicate.

The total color difference ( $\Delta E$ ) was determined from Equation 2, which indicates the magnitude of colour change after treatment.

$$\Delta E = [ (L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2 ]^{1/2} \quad (2)$$

where:  $L_0$ ,  $a_0$  and  $b_0$  are colour values of untreated juice and L, a and b those of treated samples. Differences in perceivable colour can be classified as very different ( $\Delta E > 3$ ), different ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) and with small differences ( $\Delta E < 1,5$ ) (Tiwari et al., 2008b).

### 2.5.7. Cloud

To evaluate loss of cloud or juice clarification after treatment, a spectrophotometric method was used after samples centrifugation as described by Ferrentino et al. (2009). All measurements were performed in triplicate.

Absorbance was recorded as the cloud value with distilled water used as blank. Percent of cloud change was calculated by Equation 3.

$$\text{Percent cloud change} = \frac{\text{final cloud value} - \text{inicial cloud value}}{\text{initial cloud value}} \cdot 100 \quad (3)$$

### 2.5.8. Ascorbic acid

Ascorbic acid content was measured using the 2, 6 dichloroindophenol titrimetric method (AOAC 967.21). The ascorbic acid reduced the indicator dye, 2, 6 dichloroindophenol, to colorless solution through oxidation–reduction reactions. Measurements were performed in triplicate.

### 2.6. Statistical Analysis

Using the statistical package Statgraphics Centurion XVI, multifactorial ANOVA was carried out, and LSD (Least Significant Differences) were identified, in order to evaluate the influence of the treatments considered (Ortuño et al., 2012).

## 3. Results and discussions

### 3.1. Microbiota inactivation after the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment

The inactivation of the microbiota of orange juice is shown in Table C.3.1. When the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment was applied, the total inactivation of the initial microbial load of *E.coli* and total aerobic mesophilic bacteria was obtained at the different temperatures employed. However, the initial population of *S.cerevisiae* could not be completely inactivated, obtaining levels of inactivation of 2.60, 2.24 and 2.19 log cycles at 31, 36 and 41 °C, respectively, which corresponds with average reductions of 99.7, 99.4 and 99.3%, respectively. No significant differences ( $p>0.05$ ) in the level of *S.cerevisiae* inactivation were observed related to the different temperatures employed. The difficulty to completely inactivate *S. cerevisiae* could be related with its thicker cell wall, which is of 124.8 nm, in comparison with *E.coli*, which is of 17.7 nm (Ortuño, 2014). This greater wall thickness would difficult the inactivation mechanisms, such as the chemical modification of the double lipid layer of the cellular membrane, the increase of permeability of the cell and the penetration of the SC-CO<sub>2</sub> into the cells. In a similar way to the results of the present work, Ortuño et al. (2014) obtained a reduction of 7 and 4 log units of *E.coli* and *S.cerevisiae*, respectively, starting from the same initial cell concentration, for a treatment of orange juice with SC-CO<sub>2</sub>-HPU (225 bar; 31°C; 6 min). These results support the relationship between the thickness of the cellular wall and the resistance to the SC-CO<sub>2</sub>-HPU inactivation. On the other hand, the thermal pasteurization treatment attained the complete inactivation of the assessed microbiota.

**TABLE C.3.1.** Inactivation of microbiota in orange juice at different operating conditions

Treatment / conditions	<i>E.coli</i> *		<i>S.cerevisiae</i> *		Total aerobic mesophilic*	
	No	Log No	No	-Log N/No	No	Log No
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 31 °C	5.75E+03	3.47±0.61	1.20E+05	2.61±0.40	1.22E+03	2.95±0.43
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 36 °C	1.24E+04	3.80±0.63	4.53E+04	2.24±0.21	3.66E+03	3.50±0.31
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 41 °C	1.35E+04	3.84±0.79	1.58E+05	2.19±0.02	9.65E+03	3.95±0.23
Pasteurization/ 90 °C, 1 min	9.11E+02	2.82±0.43	6.16E+03	3.54±0.54	1.03E+03	2.88±0.48

### 3.2. Effect of the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment on the physico-chemical properties of orange juice

#### 3.2.1. pH, °Brix, Titratable acidity (TA)

The results of pH, °Brix and TA are shown in Table C.3.2. The continuous treatment of orange juice using SC-CO<sub>2</sub>-HPU had a non-significant ( $p>0.05$ ) effect on the pH of the juice, similarly as what happens for the thermal treatment (Table C.3.2). No significant ( $p<0.05$ ) differences were observed between the SC-CO<sub>2</sub>-HPU and the pasteurized juice treatment. This fact could be due to the short treatment time and to the low initial pH value of the juice. In this regard, for values of 3.7-3.8 of pH, the dissociation of the carbonic acid formed by the dissolution of the CO<sub>2</sub> into the juice is difficult, due to the high dissociation constants of carbonic acid and the bicarbonate ( $pK_a=6.57$  and  $pK_a=10.62$ , respectively) (Zhou et al., 2009). Kincal et al. (2006) observed a change between 0.14% and 0.54% in the pH of orange juice treated with a continuous SC-CO<sub>2</sub> process (38, 72 and 107 MPa; 0.40-1.18 ratio CO<sub>2</sub>/juice; 40°C; 10 min). Fabroni et al. (2010) observed an increase in the pH of orange juice of around 1.47% after a treatment with a continuous SC-CO<sub>2</sub> process (230 bar; 5.08 L/h juice; 3.91 L/h CO<sub>2</sub>; 36°C; 15 min), as well as a percentage of 1.18% after thermal pasteurization. As can be observed from Table C.3.2, the range of pH values of the control samples comprises the range of pH of the treated ones, which shows the small impact of the treatment on this quality attribute, being more important the natural variability than the possible effect of the treatment.

In the case of the °Brix, the results obtained showed a slight decrease at 31 °C (-0.81%), 36 °C (-1.74%) and 41 °C (-1.41%), although non-significant ( $p<0.05$ ) differences between the control and processed juice samples were observed for any treatment. Gasperi et al. (2009) studied the use of a batch SC-CO<sub>2</sub> treatment (100 bar; 36 °C; 10 min) on apple juice, and found a percentage of reduction of 0.85%. Kincal et al. (2006) obtained reductions of approximately 1.80% after a continuous SC-CO<sub>2</sub> treatment (38 MPa; 0.40 ratio CO<sub>2</sub>/juice; 40°C; 10 min) of orange juice. As happened for the pH, the natural variability of the juice is more important than the possible influence of the treatment on the °Brix.

Finally, the results of acidity showed that although an average reduction of 4.94% was found for the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treated samples, the differences were not significant ( $p>0.05$ ) due to the high variability of the natural orange juice and the treatments.

In a similar way, Kincal et al. (2006) after a continuous SC-CO<sub>2</sub> treatment (72 MPa; 0.64 ratio CO<sub>2</sub>/juice; 40°C; 10 min) and Tiwari et al. (2008a) after an ultrasonic process (8.61-22.79 W/cm<sup>2</sup>; 2-10 min) found non-significant changes of acidity after the treatments.

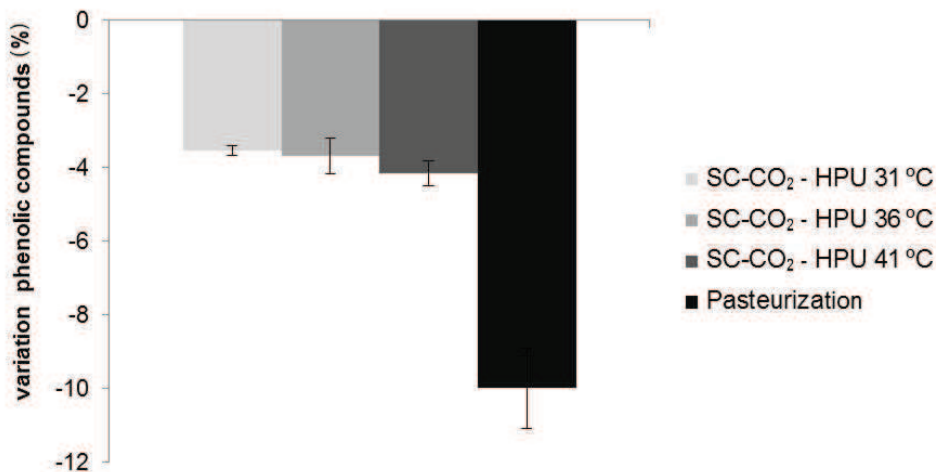
**TABLE C.3.2.** pH, °Brix and titrable acidity values for different operating conditions

Treatment / conditions	pH			°Brix			Titrable acidity (g citric acid/100ml)*		
	Control	Treated	variation	Control	Treated	variation	Control	Treated	variation
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 31 °C	3.58±0.04 <sup>a</sup>	3.60±0.05 <sup>a</sup>	0.56±0.01%	12.23±0.23 <sup>a</sup>	12.13±0.23 <sup>a</sup>	-0.81±0.3%	0.874±0.02 <sup>a</sup>	0.835±0.021 <sup>ab</sup>	-4.46±0.15%
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 36 °C	3.63±0.03 <sup>a</sup>	3.67±0.02 <sup>a</sup>	1.10±0.08%	11.46±0.06 <sup>bc</sup>	11.26±0.05 <sup>c</sup>	-1.74±0.05%	0.757±0.05 <sup>abc</sup>	0.718±0.05 <sup>bc</sup>	-5.15±0.26%
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 41 °C	3.68±0.005 <sup>a</sup>	3.69±0.005 <sup>a</sup>	0.27±0.05%	12.20±0.17 <sup>a</sup>	12.03±0.11 <sup>a</sup>	-1.39±0.12%	0.747±0.04 <sup>bc</sup>	0.708±0.04 <sup>c</sup>	-5.22±0.52%
Pasteurization/ 90 °C, 1 min	3.61±0.08 <sup>a</sup>	3.62±0.09 <sup>a</sup>	0.28±0.09%	12.03±0.12 <sup>a</sup>	11.86 ±0.05 <sup>ab</sup>	-1.41±0.23%	0.836±0.04 <sup>ab</sup>	0.829±0.04 <sup>ab</sup>	-0.83±0.11%

Different letters within a row and column for the same flow rate indicate significant differences (p < 0.05)

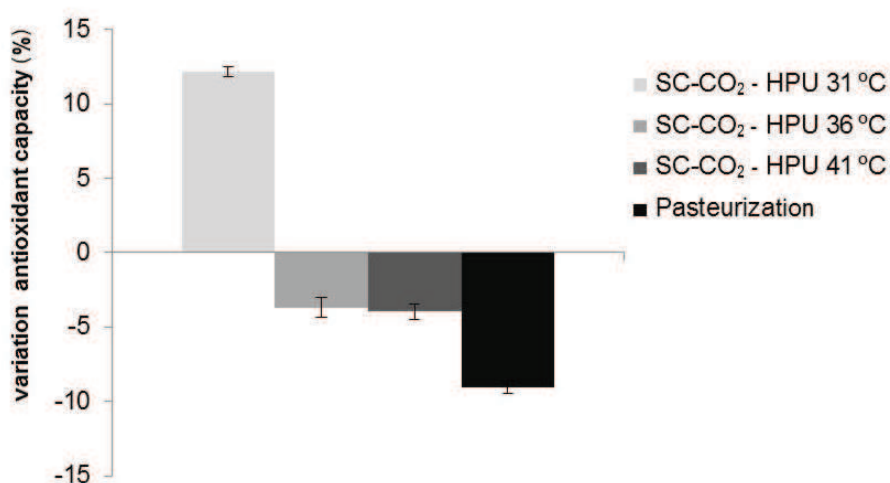
3.2.2. Phenolic compounds and antioxidant capacity

The content of phenolic compounds significantly ( $p < 0.05$ ) decreased after the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment compared to the natural juice, for all the temperatures studied (-3.54, -3.68 and -4.15% at 31, 36 and 41°C, respectively; Figure C.3.2). The differences among the treatments for this parameter were only significant ( $p > 0.05$ ) between 31 and 41°C. Moreover, a significant difference ( $p < 0.05$ ) in phenolic compounds was found between the SC-CO<sub>2</sub>-HPU and pasteurization treatments, thus, while the average decrease in phenolic compounds for SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatments was of  $-3.79 \pm 0.9\%$ , the thermal pasteurization brought about a decrease of -10%. This higher loss of phenolic compounds could be due to the high degradation of carbohydrates and organic acids during the thermal processing, which could give rise to furfurals and other carbonyl compounds which may form condensation products with polyphenols (Fabroni et al., 2010). The results found in this work are in agreement with those reported by Fabroni et al. (2010), who found reductions of 5.27% after a continuous SC-CO<sub>2</sub> treatment (130 bar; 5.08 L/h juice; 1.96 L/h CO<sub>2</sub>; 36°C; 15 min) of orange juice and 9.99% for a conventional thermal pasteurization treatment (90°C, 30 s). Therefore it seems that the use of HPU, which intensifies the microbial inactivation, do not affect negatively to the amount of phenolic compounds in the processed orange juice. In fact, Rawson et al. (2011a) observed non-significant differences in the content of phenolic compounds after a HPU treatment (24.1–60 µm; 25-45 °C; 2-10 min) of watermelon juice.



**Fig. C.3.2.** Loss of phenolic compounds content in orange juice after different treatment conditions.

The results on the antioxidant capacity showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in samples processed with SC-CO<sub>2</sub>-HPU compared to control samples (Figure C.3.3), except for treatment at 31 °C where a significant ( $p < 0.05$ ) increase (12.13%) was obtained. However, between 36 and 41 °C, there are no significant differences, leading the treatments to reductions of 3.68 and 3.96%, respectively. Therefore, the use of temperatures higher than 31°C leads to a higher reduction of the juice antioxidant capacity. On the other hand, thermal pasteurization presented a significantly ( $p < 0.05$ ) higher reduction (-9.07%) of the antioxidant capacity compared to the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatments. Fabroni et al. (2010) reported similar results after a continuous treatment with SC-CO<sub>2</sub> (130-230 bar; 5.08 L/h juice; 3.91 L/h CO<sub>2</sub>; 36 °C; 15 min) of orange juice, the percentages of antioxidant capacity decreased between 1.39 and 2.53% versus 5.50 and 10.89% for pasteurized juice. However, in the present work, at 31°C an increase in the antioxidant capacity was observed. It has been widely reported that the use of HPU can lead to the increase of the antioxidant capacity of vegetable samples, due to the increase of active compounds extracted (Vilkhu et al., 2008). Therefore in the present work two effects could be superimposed, the increase of the antioxidant capacity due to HPU and the decrease due to the SC-CO<sub>2</sub> treatment and temperature. In the case of 31°C, the result of these two effects brought about an increase of the antioxidant capacity, since the increase of extracted compounds would compensate the decrease produced by the SC-CO<sub>2</sub> treatment.



**Fig. C.3.3.** Percentage variation of antioxidant capacity in orange juice at different conditions of treatment.



### 3.2.3. Browning index and color

Tables C.3.3 and C.3.4 show the results obtained for the browning index and color, respectively. The SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment in orange juice produced a significant ( $p < 0.05$ ) increase of the browning index when compared with the control at all the treatment temperatures. The higher the temperature, the higher the browning index (Table C.3.3), however only significant differences were found between the treatment at 31 °C and the other two temperatures considered. The average difference in the browning index for the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treated samples was of 226%. A similar difference in the variation of the browning index between treated and untreated samples was observed by Tiwari et al. (2008b) in sonicated orange juice (40-100% amplitude), the browning index was increased in 636.8%. Those authors attributed the browning of samples to the destruction of pigments, mainly carotenoids, produced by the HPU. One of the main factors contributing to browning of orange juice is the ascorbic acid oxidation, appearing reactive carbonyl groups, such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which can be precursors of non-enzymatic browning (Bull et al., 2004; Yeom et al., 2000; Bharate et al., 2012). In addition, the browning effect linked to decomposition of sugars or caramelization (Vervoort et al., 2011) as well as the Maillard reactions between reducing sugars and free amino groups, leading to the formation of melanoidins, which are compounds that cause dark browning (Ibarz et al., 2010). Vervoort et al. (2011) reported that the non-enzymatic browning is accelerated by temperature and processing time as it is observed for the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment (Table C.3.3).

However, the changes in the browning index are much larger for the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment than for the thermal pasteurization, which shows that although temperature is an important factor affecting the juice browning, the mixing of the juice with SC-CO<sub>2</sub> and/or the application of ultrasound are much more determinant factors.

On the other hand, the non-enzymatic browning produced by the treatment with SC-CO<sub>2</sub>-HPU was also observed from the results of color analysis (Table C.3.4). For all the treatments, there was a decrease of L\*, a\*, b\* values. Thus, the decrease of L\* value showed the loss of brightness or increase of darkness which is directly related with the juice browning (Tiwari et al., 2008b; Yeom et al., 2000), although it could also be related with the juice cloud, because the reflected light is affected by the cloud (Liu et al., 2012). The decrease of a\* and b\* values showed the color change to both less red and yellow tonalities. Considering the  $\Delta E$  parameters, the higher color difference was

obtained in samples treated with SC-CO<sub>2</sub>-HPU at 36 °C, followed by 41 and 31 °C, while for the pasteurized juice a lower color difference was observed. Moreover, in this case, the ΔE values do not show a relationship with temperature. Therefore, with ΔE values above 3, the color changes were noticeable for all the treatments considered. A similar finding was observed by Fabroni et al, (2010) in orange juice samples after continuous treatment of SC-CO<sub>2</sub> (130 bar; 5.08 L/h juice; 1.96-3.91 L/h CO<sub>2</sub>; 36 °C; 15 min) and thermal pasteurization (88-91 °C, 30s). These authors also observed a decrease of L\*, a\*, b\* values for both types of treatments, obtaining ΔE values of 7.87-11.89 and 2.88-6.23 for continuous treatment of SC-CO<sub>2</sub> and thermally pasteurized juice, respectively. The color changes that take place after SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment could be related to the cavitation effect of HPU, which regulates various physical, chemical and biological reactions, between them, the carotenoids degradation produced by the oxidation reaction promoted by these and the free radicals formed during the treatment (Abid et al., 2013; Tiwari et al., 2008a). However, when the control and the treated sample are analyzed visually the differences are not observed.

**TABLE C.3.3.** Browning index values of orange juice processed at different conditions

Treatment / conditions	Browning Index (A420 nm)		
	Control	Treated	Variation
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/100 bar, 31 °C	0.21±0.00 <sup>a</sup>	0.66±0.02 <sup>b</sup>	216.40±7.85%
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/100 bar, 36 °C	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.75±0.01 <sup>c</sup>	228.13±4.49%
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/100 bar, 41 °C	0.22±0.00 <sup>a</sup>	0.72±0.01 <sup>c</sup>	233.49±4.03%
Pasteurization/90 °C, 1 min	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	5.38±0.19%

Different letters within a row and column indicate significant differences (p <0.05)

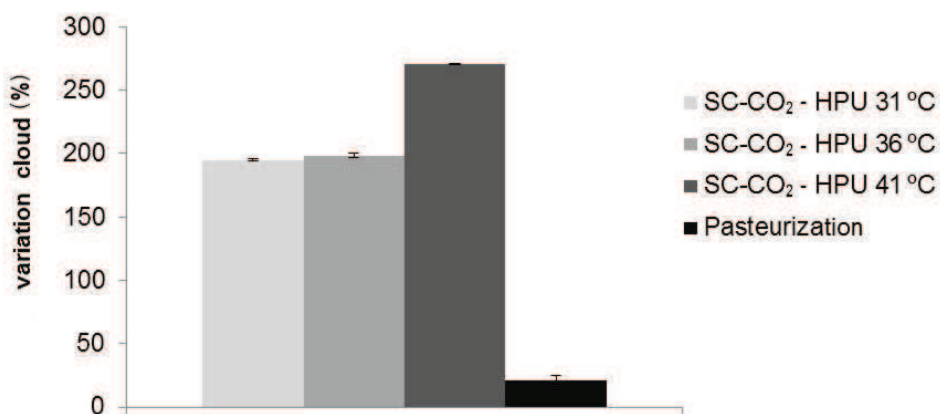
TABLE C.3.4. Color values of orange juice processed at different conditions

Treatment / conditions	Color*						$\Delta E$
	Control			Treated			
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 31 °C	33.86±2.04	4.61±1.11	56.75±3.57	29.76±2.88	0.805±1.59	49.73±4.84	8.85±0.60
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 36 °C	40.52±0.96	5.54±0.35	64.30±2.45	33.86±1.73	0.98±0.73	55.79±2.47	11.74±1.25
SC-CO <sub>2</sub> -HPU/ 100 bar, 41 °C	33.96±1.39	6.37±0.93	6.37±0.93	30.21±0.67	1.44±0.23	50.54±1.01	8.70±1.86
Pasteurization/ 90 °C, 1 min	35.00±0.25	8.25±1.20	58.74±0.26	32.42±0.13	4.52±0.28	54.47±0.18	6.27±0.87

### 3.2.4. Cloud

The cloud is related with the particle suspension which is composed of a complex mixture of proteins, pectin, lipids, hemicellulose, cellulose, and other minor components (Niu et al., 2010; Tiwari et al., 2009b). This is an important attribute that positively affects the turbidity, taste, aroma and characteristic color of orange juice. Its loss is mainly attributed to the enzymatic activity of the PME, which causes the phase separation in the juice and the resulting loss of cloud (Bull et al., 2004; Polydera et al., 2004).

The SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment in orange juice significantly ( $p < 0.05$ ) increased the cloud values when compared with the control at all the temperatures considered (Figure C.3.4), showing that there is a significant ( $p < 0.05$ ) difference between the treatments at 31 and 36 °C compared to 41 °C. The average increase in the cloud value were of 195.0, 198.4 and 270.6% at 31, 36 and 41°C, respectively; therefore, the cloud value increased when the treatment temperature increased. In a similar way, Niu et al. (2010) obtained after the SC-CO<sub>2</sub> treatment (40 MPa; 55°C; 10-60 min) of orange juice, percentages of cloud increase of 91.33-115.48%. Also, Tiwari et al. (2008a), after the ultrasonic treatment in orange juice (8.61-22.79 W/cm<sup>2</sup>; 2-10 min) obtained increases of 63-222%. As can be observed, after the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment of juice, the cloud was preserved and improved. This phenomenon is mainly due to the reduction of the enzymatic activity of the PME, as well as, the system depressurization, which homogenize juice, causing the breakdown or reduction of colloidal particles of the juice (Kincal et al., 2006; Liu et al., 2012). Another factor that contributed to the increase of the cloud is the HPU effect, which produces the rupture of the linear molecule pectin, reducing its molecular weight (Tiwari et al., 2009b). The cloud values obtained after pasteurization were significantly ( $p < 0.05$ ) lower than those obtained after treatment with SC-CO<sub>2</sub>-HPU which shows that the use of this novel technology based on SC-CO<sub>2</sub>-HPU could improve some quality attributes of orange juice while reducing the processing time compared to using only SC-CO<sub>2</sub> or HPU.

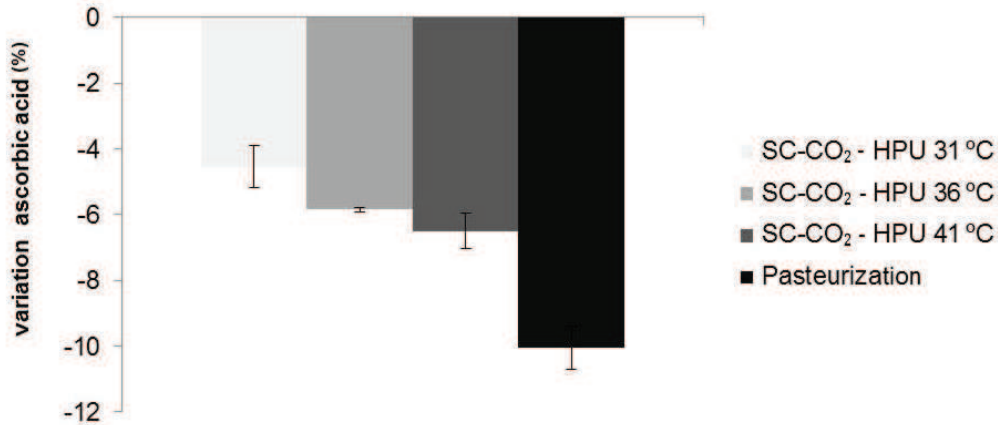


**Fig. C.3.4.** Percentage variation of cloud in orange juice at different conditions of treatment.

### 3.2.5. Ascorbic acid

The continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment in orange juice produced a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of ascorbic acid when compared with the control at different temperatures considered (Figure C.3.5). However, ascorbic acid was considerably preserved after treatments, observing reductions of only 4.55, 5.85, and 6.50%, at 31, 36, and 41 °C, respectively. As can be observed, the ascorbic acid loss increased with temperature, although, in the range considered, only significant ( $p < 0.05$ ) differences exist between the treatment at 31 and that carried out at 41°C. This slight degradation may be due to the formation of free radicals produced by the effect of cavitation generated by the HPU, leading to oxidation of polar organic compounds, such as ascorbic acid and total phenols; and it may also be due to the thermolysis produced inside bubbles and subsequent activation of the Maillard reaction (Tiwari et al, 2009a; Rawson et al, 2011b). A significant difference ( $p < 0.05$ ) in the ascorbic acid content of the juice between SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment and thermal pasteurization, was also observed, with a greater loss of ascorbic acid in the case of the thermal pasteurization (-10.05%). The higher reduction of ascorbic acid in the latter treatment can be explained by the application of a higher processing temperature, since ascorbic acid is a thermolabile nutrient (Sanchez-Moreno et al., 2005) and seems to be more affected by high temperatures than by the use of the combined treatment (SC-CO<sub>2</sub>-HPU). A similar behavior was observed by Fabroni et al. (2001) after continuous SC-CO<sub>2</sub> processing of orange juice, finding a lower reduction of ascorbic acid in SC-CO<sub>2</sub>-HPU treated samples (6.37%, 130 bar; 5.08 L / h juice; 1.96 L / h CO<sub>2</sub>; 36 ° C; 15 min) compared to the thermally pasteurized ones (88-91 °C, 30s). Also, Tiwari et al. (2009a)

obtained reductions of 1.46-5.17% of ascorbic acid after ultrasonic treatment of orange juice (from 0.33 to 0.88 W / mL; 10.2 min) and a reduction of 7.14% after thermal pasteurization. Despite of the decrease of ascorbic acid using SC-CO<sub>2</sub>-HPU, when using the lowest temperature, reductions are less than half of those found for thermal pasteurization.



**Fig. C.3.5.** Percentage variation of ascorbic acid in orange juice at different conditions treatment.

#### 4. Conclusions

The SC-CO<sub>2</sub>-HPU continuous treatment was effective for microbial inactivation in orange juice, being the effectiveness dependent on the microbial cell wall thickness. The SC-CO<sub>2</sub>-HPU continuous treatment did not affected the pH, °Brix and Titrable acidity of the juice. Moreover, compared with thermal pasteurization, the loss of phenolic compounds was small and the antioxidant capacity could be even increased with respect to the natural untreated juice. Although the treatment affected the color of the juice, causing an overall darkening, the cloud and therefore the stability of the treated juices was greatly improved. The obtained results demonstrated the potential of the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU inactivation technique, the use of mild process conditions leads to an increase in the quality of the product processed under this technique. Moreover, the fact that the proposed technique works in a continuous mode greatly facilitates its industrial implementation.

### 5. Acknowledgements

This work was supported by the PROMETEOII\2014\005 project financed by the Generalitat Valenciana (Conselleria d'Educació, Cultura i Esport, Valencia, Spain). The authors acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship awarded to PhD Student Paniagua-Martínez, I. The authors especially wish to thank Eng. Ramón Peña for his technical assistance in the development of the equipment.

### 6. References

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1182-1187.
- AOAC International. (2007). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 18th edition, 2nd revision.
- Bharate, S.S. & Bharate, S.B. (2012). Non-enzymatic browning in citrus juice: chemical markers, their detection and ways to improve product quality. *Journal of Food Science and Technology*, 1-18.
- Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., Sellahewa, J., Szabo, E.A., Johnson, R.L., Stewart, C.M. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2), 135-149.
- Calix, T.F., Ferrentino, G., Balaban, M.O. (2008). Measurement of high-pressure carbon dioxide solubility in orange juice, apple juice, and model liquid foods. *Journal of Food Science*, 73(9), 439-445.
- Damar, S. & Balaban, M.O. (2006). Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science*, 71(1), 1-11.
- Fabroni, S., Amenta, M., Timpanaro, N., Rapisarda, P. (2010). Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 477-484.
- Ferrentino, G., Plaza, M.L., Ramirez-Rodrigues, M., Ferrari, G., Balaban, M.O. (2009). Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 74(6), 333-341.

- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L., Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.
- Gasperi, F., Aprea, E., Biasioli, F., Carlin, S., Endrizzi, I., Pirretti, G., Spilimbergo, S. (2009). Effects of supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O pasteurisation on the quality of fresh apple juice. *Food chemistry*, 115(1), 129-136.
- Ibarz-Martínez, R., Pagán, J., Garza, S., Ibarz, A. (2010). Browning of clarified lemon juices treated at high temperatures. *Scientia Agropecuaria*, 1(1), 7-20.
- Khandpur, P., & Gogate, P.R. (2016). Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 337-353.
- Kincal, D., Hill, W.S., Balaban, M.O., Portier, K.M., Wei, C.I., Marshall, M.R. (2005). A continuous high pressure carbon dioxide system for microbial reduction in orange juice. *Journal of Food Science*, 70(5), 249-254.
- Kincal, D., Hill, W.S., Balaban, M.O., Portier, K.M., Sims, C.A., Wei, C.I., Marshall, M.R. (2006). A continuous high-pressure carbon dioxide system for cloud and quality retention in orange juice. *Journal of Food Science*, 71(6), 338-344.
- Liu, X., Gao, Y., Xu, H., Hao, Q., Liu, G., Wang, Q. (2010). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry*, 119(1), 108-113.
- Liu, Y., Hu, X., Zhao, X., Song, H. (2012). Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 112-119.
- Niu, L., Hu, X., Wu, J., Liao, X., Chen, F., Zhao, G., Wang, Z. (2010). Effect of dense phase carbon dioxide process on physicochemical properties and flavor compounds of orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(2), 530-548.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. (2012). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15, 31-37.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M.T., Mulet, A., Benedito, J. (2013). Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51(2), 474-481.
- Ortuño, C. (2014). Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de



- Valencia. Ortuño, C., Balaban, M., Benedito, J. 2014. Modelling of the inactivation kinetics of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and pectin methylesterase in orange juice treated with ultrasonic-assisted supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 90, 18-26.
- Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77, 685-696.
- Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M. A., Benedito, J. (2016). Ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment in continuous regime: Application in *Saccharomyces cerevisiae* inactivation. *Journal of Food Engineering*, 181, 42-49.
- Polydera, A.C., Galanou, E., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2004). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 291-298.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Rawson, A., Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P.J., O'Donnell, C. (2011a). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, 44(5), 1168-1173.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N. (2011b). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875-1887.
- Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovšek, U., Mattivi, F. (2000). Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 1996-2002.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403-4409.
- Tiwari, B.K., Mu hukuma appan, K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2008a). Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2423-2428.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'donnell, C.P., Cullen, P.J. (2008b). Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1876-1883.

- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Cullen, P.J. (2009a). Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 700-704.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'donnell, C.P., Cullen, P.J. (2009b). Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 166-171.
- Vervoort, L., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Timmermans, R.A.H, Mastwijk, H.C., Matser, A.M., Hendrickx, M.E., Van Loey, A. (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 466-477.
- Wimmer, Z. & Zarevúcka, M. (2010). A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 233-253.
- Xu, Z., Zhang, L., Wang, Y., Bi, X., Buckow, R., Liao, X. (2011). Effects of high pressure CO<sub>2</sub> treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of apple juice. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 577-584.
- Yeom, H.W., Streaker, C.B., Zhang, Q.H., Min, D.B. (2000). Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4597-4605.
- Zhou, L., Wang, Y., Hu, X., Wu, J., Liao, X. (2009). Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 321-327.
- Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M.J., Barba, F.J. (2015). Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. *Food Research International*, 77, 743-752.

# CHAPTER 4

---

**INACTIVATION OF THE MICROBIOTA AND EFFECT ON THE QUALITY ATTRIBUTES OF PINEAPPLE JUICE USING A CONTINUOUS FLOW ULTRASOUND-ASSISTED SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> SYSTEM**

**INACTIVACIÓN DE LA MICROBIOTA Y EFECTO SOBRE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD DEL ZUMO DE PIÑA TRATADO EN UN SISTEMA EN CONTINUO DE CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO ASISTIDO CON ULTRASONIDOS**

Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M.A.,  
Benedito, J.

*Innovative Food Science and Emerging Technologies*  
(In progress)

## **Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of pineapple juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system**

Paniagua-Martínez, I.<sup>1,2</sup>, Mulet, A.<sup>1</sup>, García-Alvarado, M.A.<sup>2</sup> Benedito, J.\*<sup>1</sup>

1: Food Technology Department. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

2: Chemical and Biochemical Engineering Department. Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel A. de Quevedo 2779. Veracruz, México.

### **Abstract**

Pineapple juice is consumed worldwide due to its high nutritional and sensory value. Thermal treatments are the most common technique applied for fruit juices' preservation. Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) inactivation technology represents a promising non-thermal processing method, as it promotes minimum impact on the nutritional food properties. The aim of this work was to study the combined effect of SC-CO<sub>2</sub> and high power ultrasound (HPU) on the inactivation of natural microbiota and the quality attributes of pineapple juice treated in a continuous flow system at different juice residence times (3.06-4.6 min) at 100 bar and 31 °C. In addition, changes in the vitamin C and microbiota contents of fresh and treated pineapple juice during refrigerated storage at 4°C were assessed. The results indicated that the microbiota inactivation was complete and the differences obtained in the quality attributes (2.2 % for pH, 4.8 % for °Brix, 2% for Vitamin C) were minimal. During storage, microorganisms were not able to recover and vitamin C decrease could be limited to 8.2% after 4 weeks. The results demonstrated that the SC-CO<sub>2</sub>-HPU technique could be an excellent alternative for pineapple cold pasteurization

**Keywords:** Non-thermal process; supercritical CO<sub>2</sub>; ultrasound; pineapple juice; quality attributes

## 1. Introduction

Pineapple is an important tropical fruit largely consumed in the form of processed products such as juices (Costa et al., 2013). Pineapple and consequently its juice is one of the fruits that has a higher content of antioxidant and phenolic compounds. Some of the phenolic compounds existing in pineapple juice are sinapyl-L-cysteine, N- $\gamma$ -L-glutamyl-S-sinapyl-L-cysteine, S-sinapyl glutathione, and p-coumaric (Wen and Wrolstad, 2002). Pineapple juice also contains phytosterols such as ergostanol and stigmasterol (Ng and Hupé, 1998). These phytosterols have cholesterol-lowering effect by reducing absorption of cholesterol. Vitamin C, a water soluble vitamin abundant in pineapple juice, plays an important role in human nutrition due to its high antioxidant activity. Thus, it reduces the risk of heart disease by preventing the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol. Pineapple juice is appreciated for its very pleasing aroma and flavor. It is generally drinkable in single-strength, reconstituted or concentrated forms, and can be mixed with other juices to develop new flavors for beverages and other products due to its strong acid flavor (De Carvalho et al., 2008). Conventional thermal treatments of foods, such as pasteurization, have been the first choice to extend shelf life of fruit juices. However, heating processes can affect the freshness and quality of food products which leads to consumers' rejection. Non-enzymatic browning reactions and pigment destruction have been found to be major causes of such problems (Rattanathanarerk et al., 2005), in addition, the loss of organic acids like vitamin C and the decrease of phenolic compounds causes the reduction of product quality (Gómez et al., 2011).

The demand for high quality processed foods, which preserve their natural and fresh like characteristics, has led to the development of non-thermal processing techniques, as an alternative to conventional heat treatments (Char et al., 2010). New technologies applied to foods are first and foremost of concern because of safety implications. Then, as data accumulate and microbial safety can be ensured to a satisfactory level, other concerns are addressed. These include quality attributes that involve physical (colour, viscosity, particle size, Brix, etc) and chemical (pH, flavour volatiles and composition) properties of processed products. Enzyme activity, nutritional quality and shelf life, including sensory properties, are also addressed (Balaban and Ferrentino, 2012).

The supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) processing is a non-thermal process capable of inactivating microorganisms, at relatively moderate pressures (7.3 MPa) and at temperatures (31.1 °C) low enough to avoid the thermal effects of traditional methods (Benedito et al., 2015). Beyond the critical point of CO<sub>2</sub>, the difference

between liquid and gaseous CO<sub>2</sub> no longer exist in the newly formed supercritical fluid phase, in which its viscosity is lower than in the liquid state and its density and dissolving power are higher than in the gaseous state. Therefore, the use of SC-CO<sub>2</sub> for sterilization is considered to be more effective than the use of CO<sub>2</sub> in its subcritical state (Balaban and Duong, 2014; Ortuño et al., 2014). Moreover, CO<sub>2</sub> can be used in the food industry because of its nontoxic, nonflammable, inexpensive, and GRAS status (Balaban and Duong, 2014; Calvo and Torres, 2010). Although SC-CO<sub>2</sub> technology represents an excellent non-thermal processing method, high pressures, high temperatures and long treatment times are required to guarantee the safety and stability of the food, especially in batch systems. In these systems, coupling with other technologies, such as high power ultrasound (HPU), might be necessary in order to obtain the required lethality at shorter processing times and lower treatment intensities. In order to improve the efficiency of batch SC-CO<sub>2</sub> treatments, a continuous system was developed by Paniagua et al. (2016), who studied the inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice, using the continuous flow SC-CO<sub>2</sub>-HPU at different juice residence times (3.06-9.2 min), temperatures (31-41 °C) and pressures (100-300 bars). The results demonstrated that the maximum inactivation achieved by the system was 7.8 log-cycles. However, there is no report in the literature addressing the use of this continuous technique (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) for other kinds of juices, neither the effect of the process on the processed product quality. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment in continuous regime on both the inactivation of the microbiota and the quality attributes of pineapple juice both after the treatment and during refrigerated storage.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Pineapple juice

Pineapple fruits (*Ananas comosus* L.) were purchased from a local market and kept at 4 °C. Pineapple juice was obtained by washing, peeling and extracting the fruit juice (Ultra Juicer, Robot Coupe J80, USA). Juice extraction took place just prior to processing; consequently, an extraction was required for each experiment. Each experiment required about 1.5 L of juice, 1 L was used for processing (SC-CO<sub>2</sub>-HPU), and 0.5 L served as control.

## 2.2. SC-CO<sub>2</sub>-HPU processing

A laboratory continuous regime equipment was designed and built for high power ultrasound assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment (Figure C.4.1) (Paniagua et al., 2016).

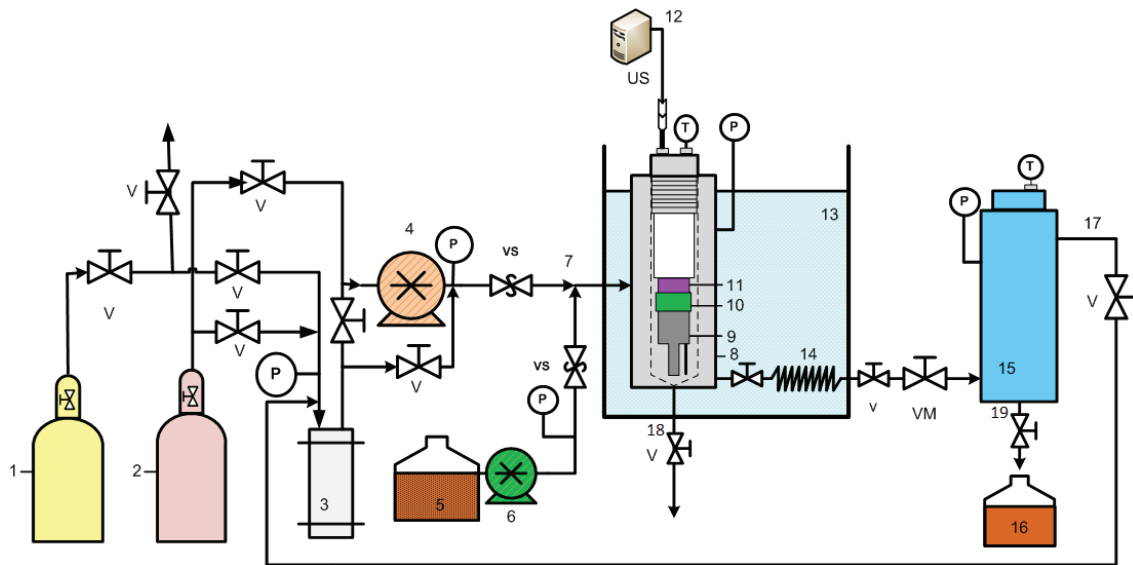
The SC-CO<sub>2</sub>-HPU process applied to the juice was as follows: first, liquid carbon dioxide was supplied from the tank to the chiller reservoir in which it was compressed to 200 bar by means of the injection of pressurized gaseous N<sub>2</sub>. The liquid CO<sub>2</sub> was supplied from the bottom of the chiller reservoir (which stores it at -18 °C) to the pump where it was compressed at the targeted pressure. Initially, the equipment was stabilized at the treatment pressure (100 bar) and temperature (31.5°C) only with SC-CO<sub>2</sub> at a constant flow rate of 5 mL/min. Then, the ultrasound equipment was connected, and once the process conditions were attained, the sample to be treated was pumped to the mixing point (7, Fig.C.4.1) where it mixed with the SC-CO<sub>2</sub>. The mixture went into the sonication vessel (8, Fig. C.4.1), where the HPU was applied. For the experiments with HPU, the power applied during the whole experiment was 40 W±5W (I=250 ±10mA; U=220 ±5 V, measured with a Digital Power Meter, Yokogawa, Model WT210). Pressure and temperature were kept constant during the experiment. The mixture of juice/SC-CO<sub>2</sub> exiting the treatment vessel went into the holding tube (14, Fig. C.4.1) and, finally, into the separation vessel (15, Fig. C.4.1), where it was depressurized and the CO<sub>2</sub> separated from the juice and recirculated to the reservoir (3, Fig. C.4.1). Prior to each experiment, the different sections of the equipment where the product flows through were cleaned and sanitized with disinfectant solution (Delladet VS2, Diversey, Spain), and distilled and autoclaved water. To determine the effect of the residence time on the quality parameters and inactivation of the microbiota of pineapple juice, two residence times (3.06 and 4.6 min) were considered. Residence time was calculated using Eq. (1).

$$\tau_{TOT} = \frac{V_{SeV} + V_{SoV}}{q + q_{CO_2}} \quad (1)$$

Where ( $V_{SoV}$ ) was the volume in the sonication vessel (40 mL) and the holding tube volume ( $V_{SeV}$ ) was 52 mL, the juice flows ( $q$ ) were 15 and 25 mL/min and the SC-CO<sub>2</sub> flow ( $q_{CO_2}$ ) was 5 mL/min.

The process conditions: pressure (100 bar), temperature (31°C) and total residence time (3.06 and 4.6 min) were selected from previous experiments in order to attain acceptable microbial inactivation levels (Paniagua et al., 2016). Before and after the

treatment, the natural microbiota and the quality attributes of pineapple juice were analyzed.



**Fig. C.4.1.** Supercritical CO<sub>2</sub> continuous treatment system. 1. CO<sub>2</sub> tank; 2. N<sub>2</sub> tank; 3. Chiller reservoir; 4. CO<sub>2</sub> Pump; 5. Liquid reservoir; 6. Liquid Pump; 7. Mixing point; 8. Sonication vessel; 9. Sonotrode; 10. Insulation joint; 11. Ceramics; 12. Power generation unit; 13. Thermostatic bath; 14. Continuous contact tube; 15. Separation vessel; 16. Treated sample; 17. CO<sub>2</sub> Recirculation; 18. Sonication vessel output, 19. Separation vessel output, V. valve; VS. non-return valve; VM. micrometric valve; P. Manometer; T. temperature sensor.

### 2.3. Microbiota analysis

The viability of mesophilic viable bacteria (MVC), yeast and *E. coli* content in the juices were determined by plate count. Each sample was serially diluted with sterilized distilled water. 100  $\mu\text{L}$  of the appropriate dilution ( $10^{-1}$  and  $10^{-2}$ ) were plated in triplicate on LB Agar, PCA Agar or YPD Agar plates and incubated for 24 h at 37 °C, 35 °C or 30 °C, for *E. coli*, MVC and yeast respectively, before counting. Results were expressed as  $-\log(N/N_0)$ , where  $N_0$  is the initial number of cells in the control sample and  $N$  is the number of cells in the sample after the different treatments. However in the case of total inactivation the results were expressed as  $\log(N_0)$ .



### 2.4. pH and °Brix

The pH of treated (TJ) and control (CJ) pineapple juice samples was measured using a digital pH-meter (pH Crison 25, Spain). Soluble solids were measured using a refractometer (Pocket Digital Refractometer Hand-held, Atago, Japan). Samples were measured in triplicate at room temperature.

### 2.5. Ascorbic acid (Vit. C)

Ascorbic acid content of TJ and CJ samples was measured using the 2, 6 dichloroindophenol titrimetric method (AOAC 967.21). The ascorbic acid reduced the indicator dye, 2, 6 dichloroindophenol, to colorless solution through oxidation–reduction reactions. Measurements were performed in triplicate.

### 2.6. Storage of treated samples

0.5 L of the control and treated samples were stored in vial glass and refrigerated at 4°C for 4 weeks. The samples were analyzed to examine the characteristics of the juice during the storage and to compare the behavior of the microbiota and vitamin C between the control and treated samples. The analyses were performed at weeks 0, 1, 2, 3 and 4.

### 2.7. Data analysis

Using the statistical package Statgraphics Centurion XVI, multifactorial ANOVA was carried out, and mean differences using Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ) was performed, in order to evaluate the influence of the used treatments.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microbiota *inactivation after the* SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment

The results of the microbiota inactivation in pineapple juice are shown in Table C.4.1. When the SC-CO<sub>2</sub>-HPU continuous treatment was applied, the total inactivation of the initial microbial load of MVC, yeast and *E.coli* was obtained at the two residence times employed. According to Garcia-Gonzalez et al. (2007), the fundamental step in the microbial inactivation by means of SC-CO<sub>2</sub> is its contact with the cell membrane

and the consequent physico-chemical modifications. The mechanisms involved in the microbial inactivation using SC-CO<sub>2</sub> include solubilization of CO<sub>2</sub> into the medium where the cells are suspended, intracellular pH decrease, key enzyme inactivation/cellular metabolism inhibition due to intracellular pH lowering, direct inhibitory effect of molecular CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> on the microbial metabolism, disordering of the intracellular electrolyte balance, and removal of vital constituents from cells and cell membranes.

As for the inactivation rate, it has been seen to increase with temperature, pressure and exposure time, where the temperature and pressure tend to synergistically act on each other (Erkmen, 2003; Lin et al., 1992). The inactivation rate is dependent on the initial number of cells, the type of bacterial species and the kind of suspended materials. On the other hand, organic compounds (such as carbohydrates, fats and others) present in the media may increase the resistance of bacteria to SC-CO<sub>2</sub> treatment (Balaban and Duong, 2014; Benedito et al., 2015).

In SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatments, the acceleration of the solubilization rate of SC-CO<sub>2</sub> into the liquid and the increase in the mass transfer due to the vigorous agitation produced by the ultrasonic field would permit the rapid saturation of CO<sub>2</sub> in the medium, which might accelerate the inactivation mechanisms (Gao et al., 2009). The other possible mechanism is the cavitation produced by HPU in the liquid phase (Gogate et al., 2011). Cavitation refers to the formation, growth, and implosion of tiny bubbles of CO<sub>2</sub> or water vapor in a liquid when ultrasounds travels through it. Cavitation has been proven to cause cracked or damaged cell walls, which enhances the penetration of SC-CO<sub>2</sub> inside the cells, changing the cellular equilibrium and facilitating the extraction of intracellular compounds, thus accelerating the death of the microbial cells. Ortuño et al. (2014) observed that after the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment, the cell wall and cell membrane were totally disrupted, thus easing the disintegration of the cytoplasm and the inactivation of cells. The damage caused by the treatment was serious enough to prevent a possible regrowth of cells. In the present research, the conditions of the treatment were mild (31.5 °C, 100 bar), however the inactivation was complete. This fact is due to the combined effect of both technologies that allow the mechanisms explained above to obtain satisfactory results.

**Table C.4.1.** Inactivation of microbiota ( $\log(N_0)$ ) in pineapple juice at different residence times (3.06 and 4.6 min)

		Treatment/Conditions	
		100 bar, 31 °C	100 bar, 31 °C
		3.06 min	4.6 min
MVC	$N_0$ (CFU/mL)	$1.40 \times 10^4$	$1.40 \times 10^4$
	N (CFU/mL)	0	0
	$\log(N_0)$	4.15	4.15
Yeast	$N_0$ (CFU/mL)	$5.80 \times 10^3$	$5.80 \times 10^3$
	N (CFU/mL)	0	0
	$\log(N_0)$	3.76	3.76
<i>E. coli</i>	$N_0$ (CFU/mL)	$6.90 \text{ E}^{+3}$	$6.90 \text{ E}^{+3}$
	N (CFU/mL)	0	0
	$\log(N_0)$	3.84	3.84

MVC: Mesophilic viable bacteria

### 3.2. Effect of the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment on the quality attributes of pineapple juice

The results obtained for the effect of the treatments on the quality attributes of pineapple juice are shown in Table C.4.2. The treatment caused a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the pH values between the CJ and TJ (2.22% and 3.61% increase for 3.06 and 4.6 min respectively). For the °Brix, results showed a slight but significant ( $p < 0.05$ ) decrease between the CJ and TJ (4.8% for both residence times). For pH there was a significant effect of the treatment time on the variation produced by the treatment, the higher the residence time the higher the variation, however no effect was observed for the °Brix. Arreola et al. (1991) measured the pH and °Brix of Valencia orange juice treated with SC-CO<sub>2</sub> at 7–34 MPa, 35–60°C and 15–180 min in a batch system. They

showed that there was no significant ( $p < 0.01$ ) difference in pH or °Brix between the original juice and the SC-CO<sub>2</sub> treated one. Kincal (2000) used a continuous-flow SC-CO<sub>2</sub> system for orange juice treatment under pressures of 38, 72 and 107 MPa, CO<sub>2</sub> juice ratios of 0.40 to 1.18, and a residence time of 10 min. This author found no significant ( $p > 0.05$ ) changes in pH and °Brix after the treatment. Moreover, Fabroni et al. (2010) studied the orange juice treated with supercritical carbon dioxide, at different treatment conditions (130, 230 bar,  $36 \pm 1$  °C, 0.385, 0.770 gCO<sub>2</sub>/gjuice; residence time was 15 min) and no statically significant ( $p > 0.05$ ) difference between treated and control samples were found for pH and °Brix. However, according to the research carried out by Bermúdez-Aguirre and Barbosa-Cánovas (2012), the application of thermo-sonication (24 kHz, 400 W) promoted significant changes ( $p < 0.05$ ) in the pH of the three juices tested (pineapple, grape and cranberry). The main changes observed in pH were attributed to the formation of certain chemical products (nitrite, hydrogen peroxide and nitrate) during the ultrasonic application. Therefore, it seems that the change of the pH observed in the present work by the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU treatment, could be mainly due to the effect of ultrasound, or the combination of both techniques (SC-CO<sub>2</sub>-HPU), rather than for the single use of SC-CO<sub>2</sub>. However, although a change in pH is observed in the present work, the final values of treated juices are within the range of pH values for natural pineapple juice.

The results of vitamin C indicated a moderate but significant ( $p < 0.05$ ) decrease between the CJ and TJ (Table C.4.2). Moreover a significant ( $p < 0.05$ ) effect of the residence time was observed, being the vitamin loss of only 1.97% for a residence time of 3.06 min and of 5.9% for 4.6 min. Fabroni et al. (2010) observed that the average vitamin C content was reduced 6.5% after a SC-CO<sub>2</sub> treatment (230 bar,  $36 \pm 1$  °C, 5.08L/h juice flow rate, 0.770 gCO<sub>2</sub>/gjuice) but remained unchanged, with respect to untreated juice, after the treatments at lower pressure, regardless of the amount of CO<sub>2</sub> employed. Ascorbic acid degradation is characterized by simultaneous aerobic and anaerobic reactions, the aerobic degradation being the fastest one (Ahrne et al., 1996). As air content is limited in SC-CO<sub>2</sub> treatment the observed vitamin degradation could be due to the effect of ultrasound in the process. Adekunle et al. (2010) observed a degradation of vitamin C (32.5%) using ultrasounds (61  $\mu$ m during 10 min). Rawson et al. (2011) observed the reduction of ascorbic acid in watermelon juice when using thermosonication. The reduction was variable, but reached the 50% when the maximum temperature (45°C), amplitude (61  $\mu$ m) and time (10 min) were employed. This behavior is mainly due to sonochemical reactions and the extreme physical conditions which occur during sonication. It is known that hydrogen ions (H<sup>+</sup>), free

radicals ( $O^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $HO^{\cdot 2}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) are formed during the sonolysis of water molecules (Feril & Kondo, 2004; Pétrier et al., 2007) present in juice samples. The ascorbic acid degradation during ultrasonic processing could be related to oxidation reactions, promoted by the interaction with free radicals formed during sonication. Hydroxyl radicals produced by cavitation may be involved in the degradation of ascorbic acid. Sonication can be related to advanced oxidative processes, since both pathways are associated with the production and use of hydroxyl radicals (Adekunte et al., 2010). Although in this research ultrasounds were employed, the ascorbic acid degradation was minimal because of the short residence times used and possibly to the lower cavitation energy found in a supercritical medium.

**Table C.4.2.** Effect of the SC-CO<sub>2</sub>-HPU continuous treatment on pH, °Brix, and Vit. C for different juice residence times (3.06 and 4.6 min)

		Treatment/Conditions	
		100 bar, 31 °C	100 bar, 31 °C
		3.06 min	4.6 min
pH	Control (CJ)	3.6±0.01 <sup>c</sup>	3.6±0.01 <sup>c</sup>
	Treated (TJ)	3.68±0.01 <sup>a</sup>	3.73±0.01 <sup>b</sup>
	Variation	2.22%	3.61%
° Brix	Control (CJ)	12.5±0.11 <sup>c</sup>	12.5±0.11 <sup>c</sup>
	Treated (TJ)	11.90±0.10 <sup>a</sup>	11.93±0.09 <sup>a</sup>
	Variation	-4.80%	-4.80%
Vit. C (ppm)	Control (CJ)	35.50±0.18 <sup>c</sup>	35.5±0.18 <sup>c</sup>
	Treated (TJ)	34.82±0.07 <sup>a</sup>	33.45±0.13 <sup>b</sup>
	Variation	-1.97%	-5.90%

Values with similar letters are not significantly different (Tukey's test, P > 0.05)

### 3.3. Microbiota changes during refrigerated storage

Microbial counts were performed every week for a storage period of 4 weeks at 4°C, this temperature was chosen to emulate refrigerated storage during retail and household storage. The initial microbial load of control juice was  $1.4 \times 10^4$  CFU/mL of MVC,  $5.8 \times 10^3$  CFU/mL of yeast and  $6.9 \times 10^3$  of *E. coli*. After 4 weeks, counts for the control juice reached values of  $9.06 \times 10^6$  CFU/mL,  $2.46 \times 10^6$  CFU/mL and  $1.17 \times 10^6$  CFU/mL for MVC, yeast and *E. coli*, respectively. In the case of the processed juices, the treatment produced an initial zero microbial count and after the 4 weeks of storage, no growth was observed. Other authors that have conducted SC-CO<sub>2</sub> inactivation treatments have found that, although just after the treatment no microbial growth was found, bacterial cells are able to recover and growth appears during product storage (Ortuño et al., 2014). However, in the present work, the combined treatment (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) provokes a critical damage to the cells which are not able to recover and therefore no growth is observed during refrigerated storage.

### 3.4. Stability of vitamin C during refrigerated storage

The results for vitamin C obtained during the 4 weeks of refrigerated storage are shown in Table C.4.3. At the beginning of the storage, the content of vitamin C in the treated juice was 33.4 and 34.8 ppm for 3.06 and 4.6 min of residence time, respectively. This value was slightly lower than that found in control (untreated) pineapple juice (35.51 ppm Vit. C / 100 mL). Vitamin C content significantly ( $p < 0.05$ ) decreased during 4 weeks of the storage, for the 3 different samples studied. The highest decrease corresponded to the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treated sample with a residence time of 3.06 min (19.5% variation) and the lowest for the control juice (6%). No change in the vitamin content was observed after 2 weeks of refrigerated storage for the SC-CO<sub>2</sub>-HPU treated samples with a residence time of 4.6 min, which shows that although the initial inactivation was higher for this residence time it provides better results during storage. Choi et al. (2002) studied the ascorbic acid retention in blood orange juice during refrigerated storage. These authors observed that ascorbic acid decreased gradually with storage time; more than 50% was lost within 3 weeks of storage and completely degraded after 5 weeks of storage for the natural juice. The decrease in vitamin C content during storage was also observed by Klimczak et al. (2007), who found the degradation of 19 % of the ascorbic acid in natural orange juice while it was refrigerated for 6 weeks. Piljac-Zegarac et al. (2009) studied the ascorbic acid degradation of six dark fruit juices (black currant, cranberry, blueberry, pomegranate,

strawberry and cherry). The juice samples were separated into two groups, with strawberry, black currant and cherry exhibiting high vitamin C content and cranberry, pomegranate, and blueberry exhibiting moderate-low vitamin C content. During refrigerated storage, the vitamin C content in blueberry juice dropped to zero after 7 days of storage, and reduced to 50% of the initial value within the first 74 h. Vitamin C showed better stability in the other juices, in the case of pomegranate and cranberry it dropped to zero after 9 days in refrigerated storage while it showed a gradual but steady decline in cherry and strawberry. By day 28, the vitamin C content of strawberry and cherry juices reduced to 58% and 35% of the initial values, respectively. According to the literature, the decrease in the vitamin C content in the juice during storage is dependent on the storage conditions such as temperature, oxygen, and light access. Oxygen is usually the main responsible for the loss of vitamin C during storage. In this regard, the significant reduction of vitamin C in the present study might be due to the presence of oxygen in the head-space of the glass bottle. Vitamin C retention has been used as indicator of shelf-life for fruit juice. It has been accepted that the shelf-life of the fruit juice could be determined by 50% loss or the half-life of the vitamin C (Odriozola-Serrano et al., 2008; Laorko et al., 2013). Therefore, according to Table C.4.3, none of the juices reached their shelf-life after the 4 weeks of refrigerated storage.

**Table C.4.3.** Analysis of vitamin C during refrigerated storage (4 weeks) of SC-CO<sub>2</sub>-HPU treated (at two different residence times) and control pineapple juices

Week	Control		Treated (residence time 3.06 min)		Treated (residence time 4.6 min)	
	ppm Vit. C	% of Variation	ppm Vit. C	% of Variation	ppm Vit.C	% of Variation
0	35.51± 0.01 <sup>a</sup>		33.4±0.10 <sup>a</sup>		34.8±0.22 <sup>a</sup>	
1	35.51± 0.01 <sup>a</sup>	0	31.81±0.08 <sup>b</sup>	-4.76	34.8±0.15 <sup>a</sup>	0
2	34.8± 0.09 <sup>b</sup>	-1.99	30.2±0.12 <sup>c</sup>	-9.58	34.8±0.08 <sup>a</sup>	0
3	34.51±0.05 <sup>c</sup>	-2.81	29.5±0.17 <sup>d</sup>	-11.67	33.38±0.05 <sup>b</sup>	-4.08
4	33.38±0.04 <sup>d</sup>	-5.99	26.9±1.02 <sup>e</sup>	-19.46	31.96±0.09 <sup>c</sup>	-8.16

Different letters within a column indicate significant differences (p <0.05)

#### 4. Conclusions

The results demonstrated the potential of the continuous SC-CO<sub>2</sub>-HPU inactivation technique. The inactivation of the microbiota was complete using mild process conditions. The changes in the different quality attributes provoked by the treatment are minimal and final values are within normal ranges for natural pineapple juice. On the other hand, the storage results showed that no microbial growth/recovery is observed and that minimal reductions of vitamin C are found. Thus, the use of mild process conditions could lead to an increase in the quality of the product treated under this technique.

#### 5. Acknowledgments

This work was supported by the PROMETEOII\2014\005 project financed by the Generalitat Valenciana (Conselleria d'Educació, Cultura i Esport, Valencia, Spain). The authors acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship awarded to PhD Student Paniagua-Martínez, I. The authors especially wish to thank Eng. Ramón Peña for his technical assistance in the development of the equipment.

#### 6. References

- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., O'Donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500-507.
- Ahrne, L. M., Manso, M. C., Shah, E., Oliveira, F. A. R., Öste, R. E. (1996). Shelf-life prediction of aseptically packaged orange juice. *Chemical Markers for Processed and Stored Foods*. Chapter 10, pp 107–117
- Arreola, A. G., Balaban, M. O., Marshall, M. R., Peplow, A. J., Wei, C. I., Cornell, J. A. (1991). Supercritical carbon dioxide effects on some quality attributes of single strength orange juice. *Journal of Food Science*, 56(4), 1030-1033.
- Balaban, M. O., Ferrentino, G. (Eds.). (2012). *Dense phase carbon dioxide: food and pharmaceutical applications*. John Wiley & Sons.
- Balaban, M.O., Duong, T. (2014). Dense phase carbon dioxide research: Current focus and directions. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 2, 2–9.
- Benedito, J., Ortuño, C., Castillo-Zamudio, R. I., Mulet, A. (2015). Microbial inactivation by ultrasound assisted supercritical fluids. *Physics Procedia*, 70, 824–827.



- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G.V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *J. Food Eng.*, 108, 383–392.
- Calvo, L., Torres, E. (2010). Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids*, 52, 134–141.
- Char, C. D., Mitilinaki, E., Guerrero, S. N., Alzamora, S. M. (2010). Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 797-803.
- Choi, M.H., Kim, G.H., Lee, H.S. (2002). Effect of ascorbic acid retention on juice colour and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35, 753–759.
- Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., De Jesus, A. L. T., Almeida, F. D. L., De Miranda, M. R. A., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S. (2013). High-intensity ultrasound processing of pineapple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 997-1006.
- De Carvalho, L. M. J., De Castro, I. M., Da Silva, C. A. B. (2008). A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. *Merril*) by micro-and ultra-filtration. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 447-45.
- Erkmen, O. (2003). Mathematical modeling of *Saccharomyces cerevisiae* inactivation under high-pressure carbon dioxide. *Food Nahr.*, 47, 176–180.
- Fabroni, S., Amenta, M., Timpanaro, N., Rapisarda, P. (2010). Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 477-484.
- Feril Jr, L. B., Kondo, T. (2004). Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound. *Journal of Radiation Research*, 45(4), 479-489.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 1–28.
- Gao, Y., Nagy, B., Liu, X., Simandi, B., Wang, Q. (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhancement by ultrasound. *Journal of Supercritical Fluids*, 49 (3), 345-350.
- Gogate, P.R., Sutkar, V.S., Pandit, A.B. (2011) Sonochemical reactors: important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems.. *Chemical Engineering Journal*, 166, 1066-1082.
- Gómez, P. L., Welte-Chanes, J., Alzamora, S. M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 447-465.
- Kincal, D. (2000). Continuous cold pasteurization of orange juice with high pressure CO<sub>2</sub>. MSc thesis, University of Florida, Gainesville, FL.

- Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., Gliszczyn´ska-Swiglo, A., (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juice. *Journal of Food Composition & Analysis*, 20, 313–322.
- Laorko, A., Tongchitpakdee, S., Youravong, W. (2013). Storage quality of pineapple juice non-thermally pasteurized and clarified by microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 554-561.
- Lin, H.-M., Yang, Z., Chen, L.-F. (1992). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide. *Biotechnol. Prog.*, 8, 458–461.
- Ng, L. K., Hupe, M. (1998). Analysis of sterols: A novel approach for detecting juices of pineapple, passionfruit, orange and grapefruit in compounded beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(4), 617-627.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. (2008). Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 272–279.
- Ortuño, C., Quiles, A., Benedito, J. (2014) Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Research International*, 62, 955–964.
- Paniagua-Martínez, I., Mulet, A., García-Alvarado, M. A., Benedito, J. (2016). Ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment in continuous regime: Application in *Saccharomyces cerevisiae* inactivation. *Journal of Food Engineering*, 181, 42-49.
- Pétrier, C., Combet, E., Mason, T. (2007). Oxygen-induced concurrent ultrasonic degradation of volatile and non-volatile aromatic compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 117-121.
- Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Martinez, S., Belscak, A. (2009). Fluctuation in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, 113, 394–400.
- Rattanathanalerk, M., Chiewchan, N., Srichumpoung, W. (2005). Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. *Journal of Food engineering*, 66(2), 259-265.
- Rawson, A., Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P. J., O'Donnell, C. (2011). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, 44(5), 1168-1173.
- Wen, L., Wrolstad, R. E. (2002). Phenolic composition of authentic pineapple juice. *Journal of Food Science*, 67(1), 155-161.

# **5. CONCLUSIONES**

---

## 5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, a continuación se describen las conclusiones más importantes obtenidas sobre la implementación, funcionamiento y funcionalidad del equipo de fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos en un sistema en continuo (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) desarrollado.

- El rediseño de sistema de inactivación mediante SC-CO<sub>2</sub> asistido por ultrasonidos de potencia en modo discontinuo, disponible en el grupo ASPA de la UPV, permitió operar el equipo en modo continuo. Fue posible bombear simultáneamente el líquido a tratar y el SC-CO<sub>2</sub>. La mezcla era bombeada al depósito de sonicación, pasada a través del tubo de mantenimiento y el CO<sub>2</sub> era separado eficazmente del líquido en el depósito separador.
- Se demostró que el sistema era efectivo para la inactivación de microorganismos tanto en un medio sencillo, como un medio de cultivo, como en un medio más complejo, como el zumo de manzana.
- La aplicación de ultrasonidos de potencia en el sistema de inactivación mostró aumentar significativamente la capacidad de inactivación microbiana del sistema tanto en el medio de cultivo como en el zumo de manzana.
- En las experiencias de puesta a punto del sistema, se observó un efecto significativo del caudal de producto tratado y por lo tanto del tiempo de residencia en el sistema, sobre la inactivación microbiana. Sin embargo la presión no resultó ser un parametro que afectara significativamente al proceso en un rango de 100-300 bar.
- El equipo de fluidos supercríticos, diseñado y construido en este trabajo, asistido por ultrasonidos y procesando en continuo (SC-CO<sub>2</sub>-HPU) demostró una elevada capacidad para inactivar (> 7 ciclos-log) *S. cerevisiae* en zumo de manzana.
- Los resultados permitieron cuantificar el efecto de las variables de proceso a través del desarrollo de un modelo híbrido real-booleano que describió el efecto

de variables reales (tiempo de residencia, temperatura y presión) y la variable discreta (aplicación o no de HPU).

- Los resultados observados de inactivación microbiana fueron mayores en el depósito separador que en el depósito de sonicación lo que confirmó la importancia del tiempo de residencia en el tubo de mantenimiento. En este tubo, líquido a tratar y zumo de manzana mantienen en contacto tras la sonicación lo que permite que se complete la acción bactericida del SC-CO<sub>2</sub> y se mejore la inactivación microbiana final.
- El aumento de la temperatura, presión y tiempo de residencia así como la aplicación de ultrasonidos de potencia aumentó significativamente la inactivación de *S. cerevisiae* en zumo de manzana, encontrándose interacciones significativas entre los diferentes factores estudiados.
- Se diseñaron estrategias de optimización multiobjetivo para calcular el tiempo de residencia mínimo que se puede emplear para alcanzar diferentes niveles mínimos de inactivación.
- Los resultados de optimización mostraron que el sistema puede lograr una inactivación de 6,8 ciclos logarítmicos en 3,1 minutos de tiempo de residencia total cuando se aplicó HPU, en lugar de 4,3 ciclos logarítmicos (en las mismas condiciones) sin HPU, lo que muestra la importancia de la influencia de los HPU en la inactivación con SC-CO<sub>2</sub>.
- El sistema en continuo desarrollado (SC-CO<sub>2</sub>+HPU), permite la inactivación efectiva de *S. cerevisiae* en tiempos cortos de proceso y empleando valores moderados de las variables de proceso lo que podría reducir los efectos perjudiciales sobre los alimentos tratados.
- El tratamiento continuo de SC-CO<sub>2</sub>-HPU fue eficaz para la inactivación de la microbiota del zumo de naranja, siendo la capacidad de inactivación del sistema dependiente del grosor de la pared celular del microorganismo. Efecto de la pared que se observó al tratar *S. cerevisiae*, *E. coli* y aerobios mesófilos.
- El tratamiento de SC-CO<sub>2</sub>-HPU en continuo no afectó significativamente al pH, °Brix y acidez titulable del zumo de naranja. Además, en comparación con la

pasteurización térmica, la pérdida de compuestos fenólicos y de vitamina C fue menor. Por otra parte, la capacidad antioxidante de los zumos de naranja tratados con SC-CO<sub>2</sub>-HPU podría incluso aumentarse con respecto al zumo natural sin tratar.

- El tratamiento mediante SC-CO<sub>2</sub>-HPU afectó al color del zumo de naranja, provocando un oscurecimiento general, sin embargo la nube y por lo tanto la estabilidad de los zumos tratados se mejoró notablemente.
- En el caso del zumo de piña, la inactivación de la microbiota fue completa, lo que indica la importancia tanto del tiempo de residencia empleado en el proceso, como del tipo de medio tratado, ya que para este zumo se emplearon las condiciones más suaves de presión y temperatura y sin embargo se alcanzó la inactivación total de microorganismos.
- Los cambios en los diferentes parámetros de calidad provocados por el tratamiento mediante SC-CO<sub>2</sub>-HPU en zumo de piña natural son pequeños y los valores finales están dentro de los rangos normales para este tipo de zumo.
- Los resultados del almacenamiento de zumo de piña mostraron que no se observa crecimiento/recuperación microbiana y que la reducción de la vitamina C es pequeña. Por lo tanto, el uso de condiciones de proceso suaves podría conducir a un aumento en la calidad del producto tratado bajo esta técnica.

Como conclusión general cabe resaltar que los resultados obtenidos demuestran el gran potencial de la técnica de inactivación de SC-CO<sub>2</sub>-HPU en sistema en continuo. La técnica desarrollada representa un gran potencial como método de conservación, ya que emplea condiciones de tratamiento suaves 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). Adicionalmente cabe señalar que la técnica propuesta, al funcionar en modo continuo, facilitaría notablemente su implementación industrial.

# **6. RECOMENDACIONES**

---

## 6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral y con el fin de aprovechar el potencial de la tecnología desarrollada (empleo de fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia SC-CO<sub>2</sub>-HPU en un sistema en continuo), se recomienda profundizar más en los siguientes aspectos:

- Estudiar el efecto de la intensidad del campo acústico y de la frecuencia del mismo, ya que otras combinaciones no ensayadas en el presente trabajo podrían incrementar los beneficios de la técnica.
- Acoplar una bomba de mayor caudal que permitiera modificar los caudales de CO<sub>2</sub>, para de esta manera incrementar la relación CO<sub>2</sub>/muestra a tratar.
- Evaluar el efecto de la tecnología combinada mediante SC-CO<sub>2</sub>-HPU en un sistema en continuo sobre microorganismos patógenos, virus, y otras cepas de bacterias, empleando diversos medios líquidos. Los medios podrían abarcar desde zumos, como en el caso del presente trabajo, hasta productos lácteos, licuados de vegetales,...
- Estudiar mediante microscopía el daño causado en los microorganismos tras el tratamiento de SC-CO<sub>2</sub>-HPU.
- En cuanto al producto tratado, sería conveniente evaluar todos los parámetros de calidad (compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, °Brix, pH, nube, índice browning, color y acidez titulable) del producto tratado tras su almacenamiento refrigerado.
- Evaluar el sistema como un posible método que permita la inactivación enzimática en diferentes productos.
- Determinar el efecto de la técnica desarrollada sobre las propiedades organolépticas de los zumos tratados, mediante el análisis sensorial de las muestras.



# **7.CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS**

---

## PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

- Ozuna, C., **Paniagua-Martínez, I.**, Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Amaya-Llano, S.L. (2015) Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International* 77, 685–696.
- Paniagua-Martínez, I.**, Mulet, A., García-Alvarado, M.A., Benedito, J. (2016) Ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment in continuous regime: application in *S. cerevisiae* inactivation. *Journal of Food Engineering* 181, 42-49.
- Paniagua-Martínez, I.**, García-Alvarado, M.A., Mulet A., Benedito, J. (In Progress. Revista: Innovative Food Science and Emerging Technologies). Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of orange juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system.
- Paniagua-Martínez, I.**, García-Alvarado, M.A., Mulet A., Benedito, J. (In Progress. Revista: Innovative Food Science and Emerging Technologies). Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of pineapple juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system

## CONTRIBUCIÓN EN CONGRESOS Y PONENCIAS

- Ingrid Paniagua**, Mercedes Carolina Rasia, Ana Hoyas, Miguel Ángel García, José Benedito. INACTIVACIÓN DE *E. coli* MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDOS POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA EN UN SISTEMA EN CONTINUO (2014). International Conference of Food Innovation. Concordia, Entre Ríos, Argentina.
- Rosa Castillo, **Ingrid Paniagua**, Carmen Ortuño, José Benedito. INACTIVATION KINETICS OF *E. coli* IN CHICKEN SAMPLES USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE ASSISTED BY HIGH POWER ULTRASOUND (2014). II International Congress, Food Technology, Quality and Safety and XVI International Symposium Feed technology. Novi Sad, Serbia.
- Ingrid Paniagua**, Rosa Castillo, Carmen Ortuño, Miguel Ángel García, José Benedito. INACTIVATION OF *E. coli* USING A CONTINUOUS FLOW ULTRASOUND-ASSISTED SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> SYSTEM (2014). II International Congress, Food Technology, Quality and Safety and XVI International Symposium Feed technology. Novi Sad, Serbia.
- Ingrid Paniagua**, Rosa Castillo, César Ozuna, Miguel Ángel García, José Benedito. Inactivación de *S. cerevisiae* mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia en un sistema en continuo (2014). XVI Congreso Internacional sobre Inocuidad de Alimentos. XXXI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

- Rosa Castillo, **Ingrid Paniagua**, César Ozuna, Miguel Ángel García, José Benedito. Inactivación de *E. coli* en jamón de pavo mediante el proceso de fluidos supercríticos asistido de ultrasonidos de potencia (2014). XVI Congreso Internacional sobre Inocuidad de Alimentos. XXXI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Nuevo Vallarta, Nayarit, México.
- Rosa Castillo, **Ingrid Paniagua**, Carmen Ortuño, José Benedito. Inactivation of *E. coli* in turkey ham with ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> (2014). EFFoST 28<sup>th</sup> International Conference. Food Science, Nutrition, Health, Sustainable Development, Amenities, Food, Technology, Science. Uppsala, Suecia.
- Ingrid Paniagua**, Rosa Castillo, Carmen Ortuño, Miguel Ángel García, José Benedito. Inactivation of *S. cerevisiae* using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system (2014). EFFoST 28<sup>th</sup> International Conference. Food Science, Nutrition, Health, Sustainable Development, Amenities, Food, Technology, Science. Uppsala, Suecia.
- Ingrid Paniagua**, Miguel Ángel García, Antonio Mulet, Ramón Peña, José Benedito. EFECTO DEL PROCESO EN CONTINUO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDOS POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE *S. cerevisiae* (2015). Jornadas de Actualización y Desarrollo en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Rosa I. Castillo, Carmen Ortuño, **Ingrid Paniagua**, A. Mulet, y José Benedito. INACTIVACIÓN DE *E. Coli* EN JAMÓN CURADO MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDOS CON ULTRASONIDOS DE POTENCIA (2015). VIII Congreso CYTA/CESIA. Conocimientos para Impulsar una Evolución Inteligente del sector alimentario. Badajoz, Extremadura, España.
- Ingrid Paniagua**, Rosa I. Castillo, Gabriela Clemente, Miguel Ángel García y José Benedito. EFECTO DEL TRATAMIENTO MEDIANTE UN SISTEMA EN CONTINUO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDO POR ULTRASONIDOS SOBRE LA CALIDAD DEL ZUMO DE NARANJA (2015). VIII Congreso CYTA/CESIA. Conocimientos para Impulsar una Evolución Inteligente del sector alimentario. Badajoz, Extremadura, España.
- Ingrid Paniagua**, Ana Hoyas, César Ozuna, Ramón Peña, Miguel Ángel García, José Benedito. Inactivation of the natural microbial flora in orange juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system (2015). 12th International Congress on Engineering and Food (ICEF12). Québec, Canada.
- T. Martínez-Ramos, I. Ruiz-Lopez, P. Hernández Carranza, C. Ochoa-Velasco, I. **Paniagua-Martínez**, E. Corona-Jiménez. Effect Of Pure Solvents And Their Mixes Binary - Ternary On Phenolic Compounds Extraction With Ultrasounds From Mango Manila (*Mangifera Indica L.*) Peels. 12th International Congress on Engineering and Food (ICEF12). Québec, Canada.

**Paniagua Martínez I.**, Castillo Zamudio R.I., Mulet Pons A., García Alvarado M.A. y Benedito Fort J.J. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN SISTEMA EN CONTINUO PARA LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDOS POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA (2015). XXXVI Encuentro Nacional Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química “Retos de la Ingeniería Química en la Globalización”. Cancún Quintana Roo, México.

**Paniagua Martínez I.**, Pérez Muelas N., Mulet Pons A., García Alvarado M.A. y Benedito Fort J.J. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE UN SISTEMA EN CONTINUO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDO POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE FLORA NATURAL DE JUGO DE NARANJA (2015). XXXVI Encuentro Nacional Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química “Retos de la Ingeniería Química en la Globalización”. Cancún Quintana Roo, México.

Castillo Zamudio R.I., **Paniagua Martínez I.**, García Alvarado M.A. y Benedito Fort J.J. APLICACION DE UN SISTEMA DE ULTRASONIDOS DE ALTA INTENSIDAD AL PROCESO DE INACTIVACION MICROBIANA MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRITICOS (2015). XXXVI Encuentro Nacional Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química “Retos de la Ingeniería Química en la Globalización”. Cancún Quintana Roo, México.

I. **Paniagua**. Ponente en la conferencia “Aplicación de un sistema en continuo de fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia como tecnología emergente para la conservación de Alimentos”. Efectuada en el Ciclo de conferencias del Instituto Tecnológico de Libres, Puebla. Marzo 2015. Libres, Puebla.

T. Meza-Gaspar, H. A. Vaquiro-Herrera, R. I. Castillo-Zamudio, **I. Paniagua-Martínez**, C. Ozuna, E. Corona-Jiménez. Obtención de pectina de guayaba (*Psidium guajava* L.var. Media China) mediante hidrólisis ácida asistida con ultrasonido de alta intensidad (2016). III Congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos. XVIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Guanajuato.

X.C. Lara-Cervantes, **I. Paniagua-Martínez**, F. Morales-Trejo, R.I. Castillo-Zamudio. Efecto de las variables de secado convectivo sobre los parámetros de color de rodajas de carambola (*Averrhoa carambola* L.) (2016). III Congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos. XVIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Guanajuato.

Rosa Castillo, C. Ozuna, **Ingrid Paniagua**, José Benedito. Assessment of power ultrasound system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide in turkey ham (2016). 4th International ISEKI Food. Austria, Vienna.

- Ingrid Paniagua**, C. Ozuna, Rosa Castillo , Miguel Ángel García, José Benedito. Ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> treatment in continuous regime: application in E. coli inactivation (2016). 4th International ISEKI Food. Austria, Vienna.
- I. Paniagua**, A. Hoyas, C. Ozuna, R. Castillo, M. García, J. Benedito. Effect on the quality attributes of orange juice using a continuous flow ultrasound-assisted supercritical CO<sub>2</sub> system (2016). 18th IUFOST – World Congress of Food Science and Technology. Dublin, Ireland.
- R. Castillo, **I. Paniagua**, C. Ozuna, J. Benedito. Use of high power ultrasound and supercritical fluids for microbial inactivation of cured ham samples (2016). 18th IUFOST – World Congress of Food Science and Technology. Dublin, Ireland.
- I. Paniagua**, R. Castillo, M. A. Mulet, M. García, J. Benedito. Inactivation of the Microbiota and Effect on the Quality Attributes of Pineapple Juice Using a Continuous Flow Ultrasound-Assisted Supercritical CO<sub>2</sub> System (2017). 16<sup>th</sup> European meeting on supercritical fluids. Lisbon, Portugal.
- I. Paniagua**, S. Guerrero, C. Ozuna, R. Castillo, M. García, J. Benedito. Inactivation of the microbiota and effect on the quality attributes of orange juice using a continuous flow ultrasound assisted supercritical CO<sub>2</sub> system. IFT17 Annual Meeting & Food Expo. Las Vegas, Nevada, June 25-28, 2017. (Accepted)
- E. Oseguera-Sánchez, A. Cerón-García, L. Fernández-López, **I. Paniagua-Martínez**, C. Ozuna. Bioactive Compound Content and Antioxidant Capacity of Solid Processing Waste from Organic and Conventional Coffee Farming. CSBE/SCGAB Annual General Meeting and Technical Conference joint with CIGR VI Technical Symposium, August 6-10, 2017. Winnipeg, Canada. (Accepted)
- S. Guerrero, C. Ozuna, A. Ramírez, **I. Paniagua**. Gamma Isotopic Analysis of Chayote (*Sechium edule*). 31st EFFoST International Conference Food Science and Technology Challenges for the 21st Century. 13-16 November 2017 | Melia Sitges, Sitges, Spain (Submitted).
- C. Ozuna, A.C. Corona, **I. Paniagua**, M. León. Effect of Power Ultrasound Application on the Protein Fractions of Chicayota Seed (*Cucurbita Argyrosperma* subsp. *Sororia*). 31st EFFoST International Conference Food Science and Technology Challenges for the 21st Century. 13-16 November 2017 | Melia Sitges, Sitges, Spain (Submitted).