



FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

**DESARROLLO DE PROCESOS COMBINADOS
DE HIGIENIZACIÓN DE ALIMENTOS BASADOS
EN LA APLICACIÓN DE RADIACIÓN UV Y
CALOR**

*DEVELOPMENT OF COMBINED TREATMENTS FOR FOOD
HYGIENIZATION BASED ON UV LIGHT AND MILD HEAT*

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Zaragoza

Presentada por:

Elisa Gayán Ordás

Directores:

Santiago Condón Usón

Ignacio Álvarez Lanzarote

RESUMEN

El tratamiento térmico es la principal estrategia de conservación de los alimentos perecederos, pero el calor puede alterar las características organolépticas y nutritivas de los productos termosensibles. Los consumidores demandan cada vez más productos que mantengan las características del alimento fresco, con un procesado mínimo y sin aditivos añadidos. Para que la industria agroalimentaria pueda satisfacer las nuevas demandas, se están explorando nuevas tecnologías de conservación como sustitutos de los actuales tratamientos térmicos, entre las que destacan las tecnologías basadas en radiación ultravioleta (UV) y las altas presiones hidrostáticas (APH). Actualmente existe un interés particular en el uso de tecnologías basadas en luz UV para la pasteurización de productos líquidos, especialmente de zumos de frutas y hortalizas. Los tratamientos de radiación UV convencionales se aplican generalmente con lámparas de mercurio de baja presión que poseen una emisión casi monocromática de luz UV-C a 254 nm, longitud de onda próxima a las de mayor efecto germicida (250-260 nm). Recientemente se está investigando la aplicación de luz pulsada mediante lámparas de xenón, que emiten pulsos de luz de corta duración, pero muy intensos, aunque tienen un amplio espectro de emisión (desde 100 a 1100 nm). El principal mecanismo de inactivación microbiana de los pulsos de luz parece ser la alteración del ADN consecuencia de la radiación UV que contienen, aunque su emisión policromática puede contribuir al efecto letal mediante otros mecanismos concomitantes. Esta Tesis Doctoral aborda el estudio del uso de radiación UV-C para la higienización de alimentos líquidos; sin embargo, este documento también incluye una breve descripción de la tecnología de luz pulsada para su mejor comprensión (Manuscrito III de la Introducción). Quizás en algún caso su aplicación podría ser más ventajosa que la de luz monocromática.

Hace décadas que se sabe que la estructura celular diana de la inactivación por radiación UV es el material genético. Para evitar los efectos letales de la radiación, los microorganismos han desarrollado mecanismos enzimáticos capaces de reparar los daños del cromosoma. Por tanto, la inactivación microbiana depende del balance entre los daños infringidos por la luz UV en el ADN y la eficiencia de los mecanismos de reparación, que a su vez determinarán la resistencia característica de cada microorganismo. Además, otros factores relacionados con la fisiología microbiana, como la fase de crecimiento y los estreses subletales previos a la irradiación, y las condiciones de recuperación después de los tratamientos pueden afectar a

la eficacia de los sistemas de reparación. El Manuscrito I de la sección de introducción resume la influencia de los principales factores microbiológicos en la resistencia a la luz UV de bacterias y esporos bacterianos. De las publicaciones existentes se deduce que, a pesar de los numerosos estudios realizados, es todavía necesario obtener datos de resistencia a la luz UV de las especies microbianas de interés en tecnología de los alimentos, conocer la variabilidad intraespecífica y profundizar en el conocimiento de aquellos factores fisiológicos y medioambientales que puedan aumentar la tolerancia a la luz UV.

Por otro lado, la eficacia letal de los tratamientos UV depende mucho de las características del medio de tratamiento, del diseño de la instalación con la que se aplican y de los parámetros de procesado. El estado del conocimiento en estos temas se resume en el Manuscrito II de la Introducción. Las características del medio de tratamiento que más afectan a la eficacia letal de la luz UV son las propiedades ópticas ya que determinan la capacidad de penetración de la radiación en el producto a tratar. A pesar de su importancia, las investigaciones sobre la relación entre la absorptividad del medio a luz UV y la inactivación microbiana son todavía escasas. Además, las propiedades ópticas del medio junto al patrón de circulación del producto y la geometría de la instalación determinan la distribución de la dosis liberada al medio, y por tanto la eficacia letal del proceso.

El primer trabajo que se planteó en esta Tesis Doctoral fue realizar un estudio sistemático de la eficacia germicida de los tratamientos de luz UV sobre distintos microorganismos de interés en los alimentos y determinar, con las cepas más resistentes, la influencia de los principales factores fisiológicos, características del medio de tratamiento y parámetros de procesado sobre la eficacia letal del tratamiento. Para realizar este estudio, y dada la importancia del diseño de los equipos UV en su eficacia, se consideró necesario diseñar y poner a punto una instalación adecuada. El equipo finalmente desarrollado consta de ocho reactores de tubos concéntricos conectados en serie. El diseño de los reactores y las condiciones de procesado se optimizaron para poder aplicar tratamientos UV en flujo continuo, liberando una dosis lo más homogénea posible al medio de tratamiento (sección de Material y Métodos).

Una vez caracterizado el equipo de luz UV se evaluó la resistencia microbiana de distintas cepas de cuatro especies de interés sanitario (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) en medios de laboratorio. Además se determinó la resistencia de algunas bacterias alterantes (*Lactobacillus* spp.), esporos bacterianos (*Bacillus* spp., *Geobacillus* spp. y *Alycyclobacillus* spp.) y levaduras (*Dekkera* spp. y *Saccharomyces* spp.) de importancia para la conservación de los alimentos. Las curvas de

inactivación frente a la luz UV mostraron una fase de hombro, consecuencia de la acción de los mecanismos de reparación del ADN, previa a la muerte exponencial, por lo que fue necesario buscar un modelo matemático adecuado para describir la cinética de inactivación y comparar los resultados. Los esporos bacterianos mostraron una mayor tolerancia a la luz UV que las células vegetativas. Dentro de estas últimas, *L. monocytogenes* resultó ser la especie más resistente y *S. aureus* la más sensible, aunque la alta variabilidad intraespecífica hizo complicado diferenciar los distintos grupos microbianos por su resistencia. Pese a ello, hay que destacar que la variación en resistencia entre géneros, especies y cepas fue muy escasa comparada con la encontrada frente al calor y otras tecnologías de conservación. La influencia del estado fisiológico de las células vegetativas en la resistencia a la luz UV se determinó en las cepas más resistentes de cada especie. Las células en fase de crecimiento exponencial de algunas especies resultaron ser algo más sensibles que las crecidas hasta la fase estacionaria, mientras que los estreses ambientales (estrés térmico, ácido, básico y oxidativo) previos a los tratamientos UV no modificaron la resistencia.

Con respecto a las características del medio de tratamiento, nuestros resultados demostraron que la inactivación por luz UV no se ve afectada ni por el pH (3,0-7,0) ni por la actividad de agua del medio (a_w 0,99-0,94). Por el contrario, el aumento del coeficiente de absorción del medio ($3-24 \text{ cm}^{-1}$) redujo la letalidad de los tratamientos. Por primera vez demostramos la existencia de una relación exponencial entre la tasa de inactivación y el coeficiente de absorción del medio, que hasta el momento se creía lineal. Esta relación exponencial resultó ser semejante para todas las especies de células vegetativas investigadas, así como de esporos bacterianos y levaduras. De estos resultados se dedujo que en medios de alto coeficiente de absorción, como son la mayoría de los zumos de frutas, la capacidad de inactivación de la luz UV sería muy limitada. De hecho, la baja capacidad de penetración de la luz UV en los alimentos es la principal limitación para su aplicación en la industria alimentaria ya que, para conseguir los objetivos de seguridad alimentaria pertinentes, sería necesario aplicar altas dosis con tiempos de exposición muy largos. Una de las posibles estrategias para mejorar la eficacia letal de la luz UV es el desarrollo de procesos combinados que potencien su efecto germicida. Debido a los prometedores resultados obtenidos combinando otras tecnologías de conservación no térmicas con tratamientos térmicos moderados, y basándonos en los escasos datos publicados al respecto, decidimos estudiar el efecto del tratamiento combinado de luz UV y calor. Los principales objetivos de esta parte de la investigación fueron: determinar el efecto de la temperatura en la eficacia

letal de la luz UV en las especies más resistentes, optimizar las posibles combinaciones y evaluar los efectos del proceso combinado en alimentos.

Para evaluar el efecto de la temperatura de tratamiento en la inactivación por luz UV, introdujimos los reactores en un baño de agua, termostatado indirectamente por un baño fuera borda, que permitió aplicar tratamientos entre 25 y 65 °C con una estabilidad térmica aceptable ($\pm 1,3$ °C). La combinación de luz UV con temperaturas moderadas aumentó la letalidad de la luz UV tanto en células vegetativas como en esporos bacterianos. Comparando las resistencias a los tratamientos térmicos y a la luz ultravioleta a temperatura ambiente con las obtenidas en los correspondientes procesos combinados (UV-H), se observó que existía un efecto sinérgico entre ambas tecnologías. El máximo efecto sinérgico se consiguió cuando ambas tecnologías se aplicaron simultáneamente, mientras que cuando se aplicaron secuencialmente el efecto se redujo o desapareció. En células vegetativas de bacterias, la magnitud del efecto sinérgico aumentó con la temperatura de tratamiento hasta alcanzar un valor máximo. A partir de esta temperatura (temperatura óptima de tratamiento), el efecto sinérgico se redujo, hasta desaparecer, debido a la gran contribución del calor a la letalidad total del proceso. Dada la notable influencia de la temperatura en la letalidad de la luz ultravioleta, lógicamente la eficacia bactericida del proceso combinado estaba determinada por el pH y la actividad de agua del medio; y, por igual motivo, la temperatura óptima de tratamiento y la magnitud del efecto sinérgico. Por el contrario, el efecto sinérgico observado en la inactivación de esporos fue independiente de la temperatura de tratamiento entre 55 y 65 °C. Estudiando el mecanismo de inactivación de las células vegetativas por el proceso combinado demostramos que el efecto sinérgico se debía a la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN, que a su vez estaba relacionado con la fluidificación de la membrana citoplasmática inducida por el calor. Además, la población de células dañadas en las envueltas celulares por el proceso combinado era mayor que la de la suma de las dañadas por ambas tecnologías aplicadas por separado. En resumen pudimos concluir, a efectos prácticos, que la baja eficacia bactericida de la luz UV en líquidos de alta turbidez y absorbancia puede compensarse aplicándola a temperaturas moderadas.

Para evaluar el potencial del proceso combinado para la pasteurización de productos líquidos optimizamos y aplicamos el tratamiento a los patógenos más resistentes suspendidos en distintas matrices alimentarias. El efecto sinérgico del proceso combinado también se dio en zumos de frutas y caldos de pollo y verduras. La termodependencia del proceso combinado, así como la temperatura óptima y la magnitud del efecto sinérgico fueron específicas de cada alimento. Por ello, desarrollamos modelos matemáticos que

permitían determinar la temperatura óptima de tratamiento y la magnitud del efecto sinérgico esperable en cualquier producto. De las ecuaciones resultantes se concluyó que ambos parámetros dependían significativamente de la resistencia al calor y de la termodependencia de esa resistencia en el microorganismo diana. Así mismo se desarrollaron modelos matemáticos para describir la inactivación por radiación UV de las especies más resistentes a distintas temperaturas, con el fin de identificar cuál sería el microorganismo de referencia en cada condición de tratamiento. Por otro lado, se establecieron las condiciones de procesado óptimas para tratar zumos que permitían alcanzar los cinco ciclos de inactivación requeridos por la legislación americana de los patógenos de mayor interés en salud pública, con un alto nivel de certeza. Para ello, se utilizaron procedimientos probabilísticos que requerían el estudio de la variabilidad letal del proceso una vez optimizado. En cualquier caso, la combinación de luz UV y temperaturas moderadas permitió conseguir los cinco ciclos de inactivación requeridos aplicando dosis más bajas a las requeridas en los tratamientos de luz UV a temperatura ambiente. Además estos tratamientos no modificaron los atributos de calidad del zumo fresco, y la combinación con calor no aumentó las pérdidas de vitamina C. También se consiguió mejorar la inactivación de enzimas alterantes, como la polifenol oxidasa y la pectin metil esterasa. En conclusión, la aplicación de luz UV a temperaturas moderadas abre la posibilidad de diseñar procesos combinados para la pasteurización de productos líquidos a nivel industrial. No obstante, el proceso deberá ser optimizado para cada producto concreto.

Finalmente, durante el desarrollo de esta tesis doctoral realice algunas estancias de investigación en otros laboratorios que me ayudaron a poner a punto algunas técnicas o a formarme en aspectos novedosos relacionados con la tecnología de las altas presiones hidrostáticas. Estas estancias dieron lugar a algunas publicaciones de interés que también se incluyen como anexos.